

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
LIPASE ALCALINA DE *FUSARIUM OXYSPOURUM*

Janaina Nicanuzia dos Prazeres

Mestre em Ciência de Alimentos

Profa. Dra. Gláucia M. Pastore

Orientadora

*Tese de Doutorado apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção de
título de Doutor em Ciência de Alimentos.*

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P899p Prazeres, Janaina Nicanuzia dos
Produção, purificação e caracterização da lipase alcalina de
Fusarium oxysporum / Janaina Nicanuzia dos Prazeres. – Campinas,
SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos.

1. Lipase alcalina. 2. *Fusarium oxysporum*. 3. Purificação. 4.
Caracterização. I. Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(ckn/fea)

Título em inglês: Production, purification and characterization of alkaline lipase from
Fusarium oxysporum

Palavras-chave em inglês (Keywords): Alkaline lipase, *Fusarium oxysporum*, Purification,
Characterization

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore
Carmen Veríssima Ferreira
Hélia Harumi Sato
Márcio André Miranda
Maricene Sabha
Yong Kun Park

Data de defesa: 18-08-2006

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Gláucia M. Pastore

UNICAMP – Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Ciência de Alimentos

Assinatura

Profa. Dra. Carmen V. Ferreira

UNICAMP – Instituto de Biologia

Departamento de Bioquímica

Assinatura

Profa. Dra. Hélia H. Sato

UNICAMP – Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Ciência de Alimentos

Assinatura

Prof. Dr. Márcio A. Miranda

UNICAMP – Instituto de Biologia

Departamento de Bioquímica

Assinatura

Dra. Maricene Sabha

UNICAMP – Faculdade de Ciências Médicas

Departamento de Farmacologia

Assinatura

Prof. Dr. Yong K. Park

UNICAMP – Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Ciência de Alimentos

Assinatura

Com carinho dedico este trabalho e agradeço a:

Frampton, meu companheiro, amigo e incentivador de todos os momentos;

Aos meus pais, Altino e Onofra, e minha irmã, Jaquelina que foram os primeiros a me apoiarem a lutar pelos meus sonhos e ideais;

A Célia e Nathália pelo amor e carinho.

“Guarda-me, ó Deus, porque em ti confio”.

Salmo 16:1

Agradecimentos

À Profa. Gláucia pela orientação, incentivo e amizade.

Aos professores dos cursos de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP por fazerem parte da minha formação.

Aos companheiros dos laboratórios de Bioaromas e Bioquímica, Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, como também do laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia/UNICAMP pela agradável convivência, amizade e colaboração.

Em especial agradeço aos meus grandes amigos Mário Maróstica, Andréia, Cedenir, Rosângela e Andreas pelo apoio em todos os momentos.

Um agradecimento especial também ao Prof. Hiroshi e a sua esposa Célia pelo apoio e incentivo, mas principalmente pela amizade sempre sincera.

Às técnicas Angélica e Beatriz, e aos funcionários Dora, Lourdes e Reginaldo pela colaboração e disponibilidade.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação e da Secretaria de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela disponibilidade e gentileza.

RESUMO

Recentemente, a aplicação industrial de lipases microbianas tem sido estendida a muitas áreas, como por exemplo, na modificação de triglicerídeos, síntese de vários compostos de ésteres e detergentes. As lipases podem ser aplicadas na limpeza de maquinários industriais ou em detergentes como sabões em pó na remoção de manchas de lipídeos em tecidos.

A linhagem de fungo *Fusarium oxysporum* 152B foi selecionada entre 216 linhagens de microrganismos isolados de amostras de frutas e solo do Nordeste do Brasil, como maior produtora de lipase alcalina extracelular em meio de cultura. Os efeitos da composição do meio, pH e temperatura foram investigados para a produção de lipase alcalina de *Fusarium oxysporum*. A máxima quantidade de atividade lipolítica produzida foi $7,12 \text{ U.mL}^{-1}$ em meio contendo óleo de oliva, peptona e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, em pH 10,0 e 30°C . Um desenho experimental 2^2 com configuração estrela, totalizando 11 experimentos, foi desenvolvido para estudar os efeitos do pH e temperatura de incubação e o máximo de atividade encontrada foi de 33 U.mL^{-1} em pH 6,0 e a 30°C . Um segundo desenho experimental 2^2 foi desenvolvido para estudar duas variáveis, composição do meio e a concentração de óleo de oliva. Máxima atividade enzimática foi produzida em meio de cultura suplementado com óleo de oliva (2% m/v).

A atividade enzimática da lipase de *Fusarium oxysporum* foi avaliada na presença de diferentes detergentes comerciais e surfactantes, através de ensaios com *p*-nitrofenilpalmitato (pNPP). A enzima foi compatível com vários surfactantes iônicos e não-iônicos como também com detergentes comerciais. Atividade lipolítica foi fortemente inibida por SDS, mas não por Triton X-100 e Triton X-114. A enzima mostrou-se estável em pH alcalino e manteve 93% da atividade durante 1 h de incubação a 60°C . A maior atividade lipolítica foi medida com triglicerídeos de ácidos graxos de cadeia média e longa ($\text{C}_8\text{-C}_{18}$). Esta enzima mostrou ampla especificidade hidrolítica para várias gorduras e óleos. Todas estas propriedades e

sua resistência a vários surfactantes e detergentes comerciais fazem desta lipase um aditivo em potencial para formulação de detergentes.

Esta lipase alcalina extracelular foi purificada cerca de 20 vezes através de cromatografia em colunas de DEAE-Sepharose e Sephacyl-200. A preparação de lipase purificada apresentou três isoenzimas em gel IEF-PAGE, com pontos isoelétricos 7,15, 6,84 e 4,55. As massas moleculares das lipases *Lip 1* e *Lip 2* foram verificadas em gel SDS-PAGE, 30 e 29 kDa, respectivamente. Comparando-se as seqüências de aminoácidos, confirmou-se que as lipases *Lip 1* e *Lip 2* são isoenzimas que apresentam alta similaridade com a lipase de *F. heterosporum*. A lipase purificada apresentou atividade ótima em pH 8,0 e 40°C, utilizando o substrato *p*-nitrofenilpalmitato. A lipase purificada mostrou-se termoestável, perdendo cerca de 50% de atividade durante 1h de incubação a 40°C em pH 8,0.

Um método de separação e purificação foi estudado para a obtenção da lipase do meio de cultura. Os experimentos foram desenvolvidos com o surfactante não-iônico Triton X-114. Dois parâmetros foram estudados, pH e taxa de fluxo de nitrogênio. A máxima recuperação desta lipase foi verificada em pH 8,5 e fluxo de 60 mL N₂ min⁻¹. Após otimização, uma taxa de enriquecimento de 8,77 e um fator de purificação de 5,86 foram atingidos para esta enzima com uma recuperação de 93,56%. O fracionamento com espuma foi aplicado com sucesso para a concentração da lipase do meio de cultivo.

SUMMARY

Recently, industrial application of the microbial lipases has been extended in many areas, exemplified by their use in modification of triglycerides, synthesis of various ester compounds and additives in detergents. Lipases are potentially suitable for lipid stain removal applications in washing industrial machine and household detergents.

One strain *Fusarium oxysporum* 152B was isolated from fruit and soil samples from Northeast of Brazil, which produced the largest amount of extracellular alkaline lipase in the culture media. The effects of medium composition, pH and incubation temperature conditions were investigated to alkaline lipase production. The maximum amount of lipolytic activity produced was 7.12 U.mL^{-1} in medium containing olive oil, peptone and yeast extract, as carbon and nitrogen sources, at pH 10.0 and 30°C . A 2^2 factorial design with star configuration, totaling 11 experiments, was carried out to study the effect of pH and incubation temperature conditions and the maximum lipase activity was found of pH 6.0 and 30°C conditions (33 U.mL^{-1}). A second experimental design, 2^2 factorial was developed to study two variables, medium composition and olive oil concentration. Maximum enzyme activity was produced in culture medium supplemented with olive oil (2% w/v).

Enzymatic activities of lipase from *Fusarium oxysporum* were compared through spectrophotometric *p*-nitrophenylpalmitate (pNPP) assay at different commercial detergents and surfactants. The enzyme was compatible with various ionic and non-ionic surfactants as well as commercial detergents. Lipase activity was strongly inhibited by SDS, but not by Triton X-100 and Triton X-114. The enzyme was stable at alkaline pH and remained 93% of activity during 1 h incubation at 60°C . The highest lipase activity was measured with triglycerides of middle and long chain fatty acids ($\text{C}_8\text{-C}_{18}$). This enzyme showed a broad specificity/hydrolytic activity towards various fats and oils. All these properties and its resistance towards various surfactants and detergents make this lipase a potential additive for detergent formulation.

The extracellular alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* was purified 20-fold, using DEAE-Sepharose and Sephacyl-200 chromatography. The purified lipase presented three isoenzymes in IEF-PAGE, with the following isoelectric points 7.15, 6.84 and 4.55. The molecular mass were determined to *Lip* 1 and *Lip* 2 in SDS-PAGE as 30 and 29 kDa, respectively. Comparing the amino acids sequences, *Lip* 1 and *Lip* 2 were confirmed to be isoenzymes and high similarity with the lipase from *F. heterosporum*. The purified lipase showed optimum activity in pH 8.0 and 40°C, using *p*-nitrophenylpalmitate as substrate. The purified lipase showed to be thermostable, losing around 50% of activity under 1h incubation at 40°C in pH 8.0.

A separation method was performed to recover alkaline lipase from *F. oxysporum* cultures. Experiments were carried out with non-ionic surfactant Triton X-114. Two parameters were studied, pH and nitrogen flow rate. The maximal recovery of this lipase was verified at pH 8.5 and 60 mL N₂ min⁻¹ conditions. After optimization, an enrichment ratio of 8.77 and a purification factor of 5.86 were achieved for this enzyme along with 93.56 % recovery. Foam fractionation showed to be an efficient method for lipase recovery from culture broths.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
Lipases: definição e disponibilidade.....	3
Aplicações das lipases.....	9
Lipases alcalinas.....	12
Referências Bibliográficas.....	16
CAPÍTULO 1: Seleção de microrganismos produtores de lipase alcalina extracelular.....	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
Material biológico.....	26
Seleção de microrganismos produtores de lipase.....	26
Seleção de microrganismos em meio líquido.....	26
Determinação da atividade lipolítica.....	27
Identificação taxonômica de fungos.....	28
Identificação de espécies de <i>Fusarium</i> através de técnicas moleculares.....	28
Extração de DNA genômico.....	28
Reação da cadeia da polimerase (PCR).....	29
Clonagem dos produtos de PCR.....	29
Extração de DNA plasmidial.....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
Isolamento e seleção.....	30
Identificação taxonômica de fungos.....	32
CONCLUSÕES.....	38
AGRADECIMENTOS.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

CAPÍTULO 2: Fatores que afetam a produção de lipase alcalina extracelular por <i>Fusarium oxysporum</i>.....	41
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
INTRODUCTION.....	43
MATERIAL AND METHODS.....	45
Strains.....	45
Isolation and screening of lipase-producing microorganisms.....	45
Screening of lipase-producing microorganisms.....	45
Effect of medium components in lipase production from <i>F. oxysporum</i>	46
Factorial design.....	46
Assay of Lipase.....	46
RESULTS AND DISCUSSION.....	47
Screening of lipase-producing microorganisms.....	47
Effect of medium components in lipase-production from <i>F. oxysporum</i>	48
ACKNOWLEDGEMENTS.....	55
REFERENCES.....	55
CAPÍTULO 3: Caracterização da lipase alcalina de <i>Fusarium oxysporum</i> para formulação de detergente.....	59
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	60
INTRODUCTION.....	61
MATERIAL AND METHODS.....	62
Strain.....	62
Chemicals.....	62
Lipase production.....	62
Assay of Lipase.....	63
Assay using olive oil as substrate.....	63
Assay using different fats and oils as substrates.....	63
Assay using <i>p</i> -nitrophenylpalmitate (<i>p</i> NPP) as substrate.....	63
Effect of pH.....	64

Effect of temperature.....	64
Effect of surfactants and commercial detergents.....	64
RESULTS AND DISCUSSION.....	65
CONCLUSION.....	70
ACKNOWLEDGEMENTS.....	70
REFERENCES.....	70
CAPÍTULO 4: Purificação e algumas características da lipase alcalina	
extracelular de <i>Fusarium oxysporum</i>.....	73
RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	74
INTRODUÇÃO.....	75
MATERIAL E MÉTODOS.....	76
Produção de lipase.....	76
Purificação da lipase de <i>F. oxysporum</i>	77
Fracionamento com sulfato de amônio.....	77
Purificação da lipase em coluna de DEAE-Sepharose fast flow.....	77
Purificação da lipase em coluna de Sephacryl-200 fast flow.....	77
Elektroforese em gel de poliacrilamida em condições denaturantes (SDS-PAGE).....	78
Elektroforese de focalização isoelétrica (IEF-PAGE) e coloração para atividade de lipase.....	79
Coloração para detecção de proteína em gel SDS-PAGE ou IEF-PAGE	80
Coomassie Brilliant Blue.....	80
Prata.....	80
Determinação da atividade de lipase.....	80
Efeito do pH na atividade de lipase.....	81
Efeito da temperatura na atividade de lipase.....	81
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
Purificação da lipase alcalina extracelular de <i>Fusarium oxysporum</i>	82
Caracterização da lipase de <i>Fusarium oxysporum</i> purificada após gel filtração.....	91

CONCLUSÕES.....	93
AGRADECIMENTOS.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
CAPÍTULO 5: Aplicação de fracionamento com espuma para recuperação de lipase alcalina extracelular de culturas de <i>Fusarium oxysporum</i>.....	103
RESUMO.....	103
ABSTRACT.....	104
INTRODUCTION.....	105
MATERIAL AND METHODS.....	106
Strains.....	106
Chemicals.....	106
Lipase production.....	107
Protein estimation.....	107
Lipolytic assay.....	107
Foam fractionation.....	108
Calculations.....	109
RESULTS AND DISCUSSION.....	109
Alkaline lipase production under different medium composition.....	109
Foam fractionation for alkaline lipase recovery from the culture supernatant.....	111
CONCLUSION.....	115
ACKNOWLEDGEMENTS.....	115
REFERENCES.....	115
CONCLUSÕES GERAIS.....	119

INTRODUÇÃO

Os microrganismos são caracterizados pelo fato de poderem sintetizar enzimas extracelulares, as quais possuem maior atividade em relação às enzimas intracelulares. Esta característica aplica-se a lipases e a produção destas enzimas, por microrganismos, é de fato, mais vantajosa do que outras fontes.

As lipases (E.C.3.1.1.3) são esterases capazes de hidrolisar ésteres insolúveis em água como triacilgliceróis de cadeias longas. Essas enzimas também catalisam reações de esterificação e transesterificação quando presentes em meio não aquoso.

O potencial biológico das lipases é revelado pela sua capacidade não unicamente de hidrolisar triglicerídeos, mas também de sintetizá-los a partir de gliceróis e ácidos graxos. As principais aplicações para as lipases incluem componentes dos detergentes, testes de diagnósticos, processamento de óleos para a indústria de alimentos e biotransformação. Atualmente, há um crescente interesse no desenvolvimento de novas aplicações para as lipases em produtos e processos, particularmente em indústrias de laticínios, hidrólise de óleos e gorduras, e aplicações em detergentes. Adicionalmente, são essenciais para o desenvolvimento de “flavours” e aromas característicos em muitos alimentos e, no entanto, podem hidrolisar lipídeos e produzir sabor rançoso em leite, produtos lácteos e outros alimentos contendo gordura.

Os lipídeos são importantes componentes de águas residuais que causam severos problemas ambientais. Eles podem formar filmes sobre a superfície da água, obstruindo a difusão de oxigênio do ar para a água, levando à morte da vida aquática. Os fosfatos podem ser usados como agentes sintéticos de limpeza, porém são conhecidos por poluir águas potáveis. Para enfrentar os efeitos negativos sobre o tratamento de resíduos industriais contendo gorduras, algumas estratégias para a remoção de lipídeos, como o uso de lipases, tem despertado maior atenção nestes últimos anos devido à restritiva regulação ambiental. As lipases têm sido aplicadas como agentes de limpeza não somente pela sua alta

eficiência, mas também por razões de proteção ambiental. Outro importante fator para o uso de enzimas como agentes de limpeza é permitir lavagem em baixas temperaturas e então reduzir os gastos com energia.

Neste trabalho, foram isolados 216 microrganismos, dos quais apenas um foi selecionado por apresentar maior atividade lipolítica extracelular em condições alcalinas. Este microrganismo foi identificado como *Fusarium oxysporum*. Os objetivos deste trabalho foram estudar a produção de lipase alcalina em diferentes meios de cultura e avaliar o efeito do pH e temperatura na produção de enzima. Foi estudado o efeito do pH, da temperatura, de surfactantes e detergentes na atividade e estabilidade da lipase bruta. A lipase foi purificada e caracterizada.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Lipases: definição e disponibilidade

As lipases (triacil glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) catalisam a hidrólise de gorduras a monoglicerídeos, diglicerídeos, ácidos graxos livres e glicerol. A reação é reversível em ambientes micro-aquosos e sobre baixas concentrações de água encontram-se reações de síntese como: esterificação, alcoólise, acidólise, transesterificação, lactonização e aminólise ou síntese de amidas.

A superfamília de α/β -hidrolases compreende uma ampla variedade de enzimas cujas atividades dependem principalmente de uma tríade catalítica usualmente formada por resíduos de Ser, His e Asp. Esta tríade é funcionalmente (mas não estruturalmente) idêntica às de tripsina e subtilisina. Nas seqüências de aminoácidos das α/β -hidrolases os três resíduos seguintes estão na ordem Ser-Asp-His. O resíduo de serina usualmente aparece num penta-peptídeo conservado Gly- X_1 -Ser- X_2 -Gly, onde X_1 é uma Try ou His. As α/β -hidrolases notavelmente incluem enzimas lipolíticas (Bornscheuer, 2002; Arpigny et al., 1999; Jaeger et al., 1999; Gill e Parish, 1997).

Um outro elemento estrutural característico encontrado em muitas lipases é uma α -hélice chamada de “lid” que cobre o sítio ativo na ausência de um substrato (Figura 1). A “lid” pode mover quando em contato com uma interface lipídio-água expondo a chamada conformação aberta da enzima. Esta observação serve como explicação para o fenômeno de ativação interfacial, aumentando a atividade enzimática, bem como a agregação das moléculas de substrato (Eggert et al., 2002; Jaeger et al., 1999; Gill e Parish, 1997).

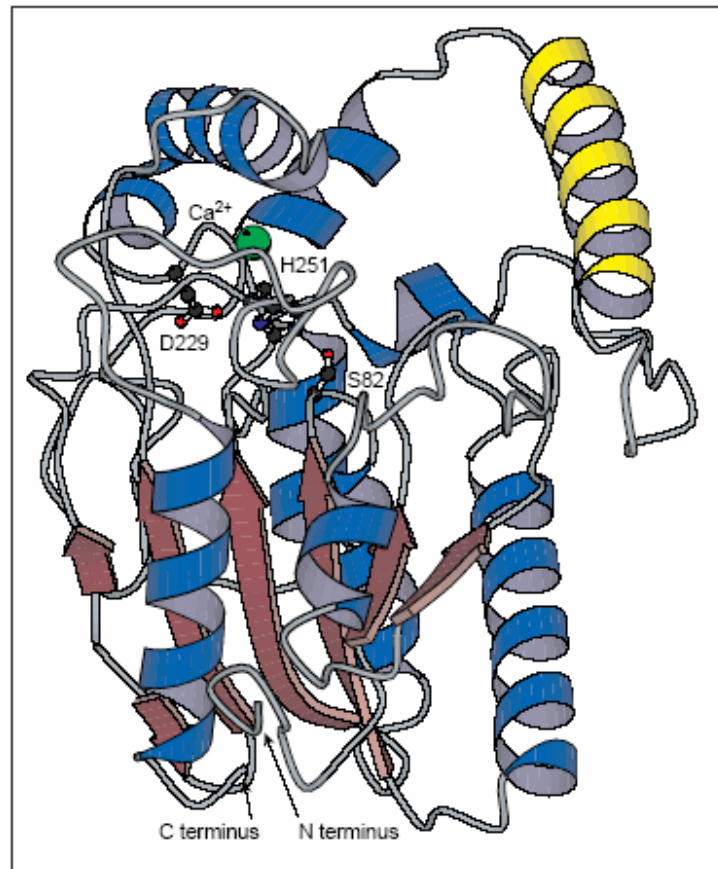


Figura 1: Estrutura da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* baseada no modelo construído para lipase de *Burkholderia cepacia* usando o raio-X coordenado determinado. Fitas- β são representadas como flechas (vermelho amarronzado) e α -hélices como rolo (azul e amarelo); a hélice amarela pode formar uma “lid” sobre o sítio ativo. Os resíduos do sítio ativo Ser82, Asp229 e His251 estão marcados, e a posição potencial do íon Ca^{2+} é indicada pela bola verde (Jaeger and Reetz, 1998).

As lipases podem ser distinguidas das esterases pelo fenômeno de ativação interfacial, a qual foi unicamente observada para lipases (Bornscheuer, 2002; Holmquist et al., 1997). Enquanto as esterases obedecem à cinética clássica de Michaelis-Menten, as lipases necessitam de uma concentração mínima de substrato para que uma alta atividade possa ser observada (Figura 2).

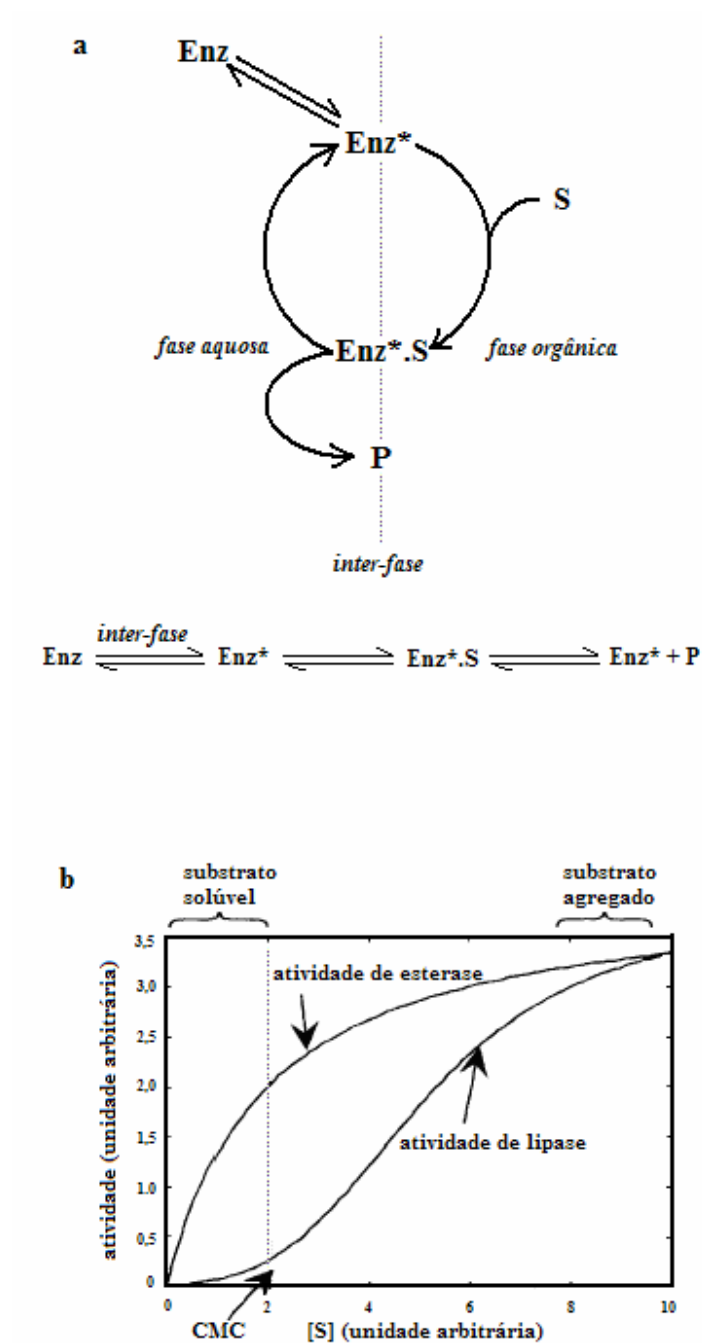


Figura 2: (a) Mecanismo de ação das lipases pela ativação interfacial na interface óleo-água. S é o substrato e P é o produto. (b) Atividade das esterases e lipases em solução aquosa. $[S]$ é a concentração de substrato e CMC é a concentração micelar crítica do substrato (Gill e Parish, 1997).

Outra característica marcante das lipases para diferenciá-las das esterases é a sua preferência por substratos insolúveis em água, tipicamente triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeias longas, enquanto as esterases preferem hidrolisar ésteres “simples” e usualmente triglicerídeos contendo cadeias de ácidos graxos menores do que C₆ (Tabela 1).

Tabela 1: Diferenças entre lipases e esterases

Propriedades	Lipase	Esterase
Especificidade pelo substrato	Triglicerídeos de cadeia longa, álcoois secundários	Ésteres simples, triglicerídeos de cadeia curta
Ativação interfacial	Sim	Não
Hidrofobicidade do substrato	Alta	Alta a baixa
Enantioseletividade	Usualmente alta	Alta a inexistente
Estabilidade no solvente	Alta	Alta a baixa

A preferência das lipases por substratos água-insolúveis e sua adsorção sobre a interface óleo/água antes da hidrólise envolve mudanças conformacionais substanciais da arquitetura enzimática durante catálise; isto tem sido particularmente bem documentado para lipases de origem eucariótica (Arpigny et al., 1999; Jaeger et al., 1999).

A água parece ter dois efeitos sobre o sistema enzimático: desempenha um papel essencial na aquisição e manutenção da conformação cataliticamente ativa da enzima no seu valor ótimo de pH; e também desempenha um importante papel em muitos processos de inativação, em particular aqueles revelados para inativação térmica (Gentili et al., 1997).

Um dos problemas enfrentados pelas indústrias é encontrar enzimas que sejam estáveis a altas temperaturas e a drásticas condições de pH. As extremozimas (enzimas derivadas de microrganismos extremófilos e que podem ser utilizadas para biocatálise em aplicações industriais extremas) e enzimas termofílicas podem

solucionar este problema por serem ativas em condições extremas e serem mais termoestáveis e mais resistentes à denaturação por proteólise e agentes químicos do que enzimas mesofílicas. Fatores estruturais que contribuem para a estabilidade destas enzimas compreendem alterações em resíduos de aminoácidos, aumentado número de pontes salinas, aumentado conteúdo de interações hidrofóbicas intersubunidades, associação cooperativa e mudanças nas áreas de superfície expostas ao solvente (Fuciños et al., 2005).

Os microrganismos têm sido amplamente usados para a produção de uma variedade de enzimas. A biossíntese de muitas hidrolases pode ser regulada e direcionada pela seleção de condições de cultivo apropriadas, particularmente no que se diz respeito aos meios de crescimento (Davranov, 1994). Somando a isto, muitas enzimas microbianas são produzidas em resposta a indutores os quais muitas vezes são adicionados ao meio nutriente; a atividade da enzima induzida em resposta ao substrato adicionado aumenta em número durante o crescimento microbiano, enquanto a quantidade de enzima formada no meio sem o indutor é mínima. Muitas lipases microbianas são produzidas unicamente na presença de um indutor, que pode ser um triglicerídeo, um ácido graxo ou outro lipídeo. Lipídeos ou ácidos graxos parecem não ser requeridos para a produção de atividade lipolítica em um segundo grupo de microrganismos, mas a incorporação destes compostos aumenta o nível de atividade lipolítica produzida. Em um terceiro grupo de microrganismos, as lipases são produzidas constitutivamente (Rapp, 1995).

Embora as lipases estejam amplamente distribuídas entre a flora e fauna, elas são mais amplamente encontradas na flora microbiana como em: 1. bactérias como *Pseudomonas* sp. (Martínez & Soberón-Chavéz, 2001; Choo et al., 1998; Gerritse et al., 1998), *Bacillus* sp. (Kennedy e Lenarz, 1979), *Staphylococcus* sp. (Simons et al., 1997) e *Alcaligenes* sp. (Souza Neto, 1996); 2. fungos como *Aspergillus* sp. (Costa, 1996), *Rhizopus* sp. (Soberon Lozano, 2001; Costa, 1997), *Geotrichum* sp. (Macedo, 1995); *Fusarium oxysporum* (Hoshino et al., 1992) e *Fusarium* sp. (Nagao et al., 2002; Nagao et al., 2000; RAPP, 1995); 3. leveduras como *Candida* sp.

(Rotticci-Mulder et al., 2001). As lipases também são encontradas em pâncreas de mamíferos e plantas superiores (Pandey et al., 1999).

Comercialmente, as lipases podem ser classificadas em algumas famílias baseadas na homologia de suas estruturas primárias: I. *Burkholderia cepacia*, II. *Pseudomonas fluorescens*, III. *Candida antarctica*, IV. *Candida rugosa* e V. *Rhizomucor miehei*. As lipases de uma mesma família são similares não somente na sua estrutura tri-dimensional, mas também em suas propriedades enzimáticas. Por exemplo, muitas lipases de *B. cepacia* agem sobre ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), mais especificamente em ácidos graxos C18 insaturados. Lipases de *C. antarctica* possui ampla especificidade e age fortemente sobre PUFAs, comparadas às lipases de *C. rugosa* que agem sobre PUFAs mais fracamente. O grupo da família de *R. miehei* inclui enzimas usadas industrialmente na produção de substituinte de gordura de cacau, 1,3-dioleoil-2-palmitoil-glicerol (OPO, comercialmente conhecido como Betapol) e diacilglicerol (Nagao et al., 2002).

Lipases microbianas podem hidrolisar gorduras animais, óleos vegetais e sintetizar mono-, di- e tri-glicerídeos. Triglicerídeos sintéticos são os melhores substratos para muitas lipases microbianas. As lipases podem ser divididas em dois grupos: **1.** lipases específicas que hidrolisam as ligações ésteres do complexo na primeira e segunda posições. Muitas lipases microbianas normalmente hidrolisam a primeira ligação éster do complexo (o α -éster ligado). Os hidrolisados produzidos por estas enzimas geralmente contêm ácidos graxos, 2,3- e 1,2-diglicerídeos e 2-monoglicerídeos. Após longos períodos de hidrólise, os resíduos de ácidos graxos 2-monoglicerídeo migram para a posição 1 para formar 1-monoglicerídeo, os quais são facilmente hidrolisados pela lipase específica para formar glicerol e ácidos graxos. Este grupo inclui lipases de *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus microsporus*, *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas* sp., etc. **2.** lipases não específicas, que não distinguem entre as ligações ésteres das três posições da molécula de triglicerídeo, e pode totalmente hidrolisar o substrato. Os hidrolisados de triglicerídeos produzidos por este grupo de enzimas geralmente

contêm resíduos de triglicerídeo (a porção não hidrolisada), glicerol e ácidos graxos. Exemplos deste grupo têm sido isolados de *Geotrichum candidum*, *Oospora lactis*, *Humicola lanuginosa*, *Staphylococcus aureus*, etc.

Aplicações das lipases

As lipases têm sido amplamente usadas em aplicações biotecnológicas na indústria de leite, processamento de óleos, produção de surfactantes e preparação de compostos enantiomericamente puros. Cada aplicação da lipase depende de suas propriedades no que diz respeito a sua especificidade, estabilidade, temperatura e pH, e/ou a habilidade de catalisar reações de síntese de ésteres em soluções orgânicas (Lin e Ko, 2005). Alguns exemplos de aplicações estão listados abaixo.

1. Produção de compostos de aroma

O uso de lipases em reações de esterificação em meio livre de solventes é uma boa alternativa para produzir compostos de aroma para a indústria de alimentos. Alguns estudos mostram alta potencialidade para a indústria pela obtenção de terpenos modificados. Ésteres do álcool citronelol acíclico terpeno com ácidos graxos de cadeia curta são importantes compostos de aromas e fragrâncias. Melo et al. (2005) estudaram a síntese do butirato citronelil e valerato citronelil através da lipase microbiana produzida por *Rhizopus* sp.. Esta lipase mostrou maior habilidade para a síntese do butirato citronelil.

Macedo et al. (2004) estudaram a otimização da esterificação do álcool isoamil e ácido butírico usando lipases de *Geotrichum* sp. e *Rhizopus* sp.. Este estudo mostrou que a lipase de *Rhizopus* sp. foi mais efetiva na síntese de butirato isoamílico, após curtos períodos de reação, enquanto a lipase de *Geotrichum* sp. apresentou alto teor de síntese após 72h de reação.

A lipólise não controlada pode produzir sabores desagradáveis pelo acúmulo de ácidos graxos livres e centrifugação prolongada é requerida para removê-los. Por outro lado, o sabor específico de queijos depende particularmente da presença de ácidos graxos de cadeias curtas formados pela hidrólise parcial de gorduras do leite por lipases produzidas por microrganismos e aquelas já presentes naturalmente no leite. O sabor picante e característico de queijos italianos é devido a ácidos graxos de cadeia curta específicos produzidos por estas enzimas que são adicionadas ao leite. Lipases podem ser usadas para modificar gorduras que são aplicadas como produtos de panificação. Gorduras modificadas podem melhorar o sabor, cor, maciez e estrutura do pão (Davranov, 1994).

A lipólise de gorduras produz ácidos graxos, os quais são compostos de aroma que possuem notas de queijo ou semelhantes, especialmente ácidos graxos de cadeia curta. A lipólise pode ocorrer quando a gordura está acessível a lipases ou esterases (Alewijin et al., 2005).

2. *Produção de biodiesel*

A conversão de óleo vegetal a metil ou outro álcool éster de cadeia curta pode ser catalisado em uma única reação de transesterificação usando lipases em solventes orgânicos (Jaeger e Eggert, 2002). A transesterificação de óleo de soja com metanol para produção de biodiesel tem sido estudada por Du et al. (2005).

3. *Alimentos funcionais*

Estudos recentes têm mostrado que diglicerídeos possuem propriedades nutricionais e efeitos na dieta. Os 1,3-diglicerídeos são capazes reduzir a concentração sérica de triglicerídeos, resultando num decréscimo do peso corporal e gordura visceral. Um tipo de óleo para cozimento composto de diglicerídeos, constituído de cerca de 70% de 1,3- e 30% 1,2- isômeros, clamado por ser

benéfico clinicamente, está disponível comercialmente no Japão e nos USA (ADM Kao LLC, www.enovaiol.com) (Guo e Sun, 2005).

4. Aplicações farmacêuticas

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos para a hidrólise seletiva de óleo de peixe por lipases para concentrar n-3 PUFA (ácidos graxos poli-insaturados). N-3 PUFA como EPA (ácido icosapentaenóico) e DHA (docosahexaenóico) têm efeitos farmacológicos em relação a doenças do coração e outras doenças relevantes (Hoshino et al., 1992).

A lipase de *Geotrichum candidum* tem mostrado uma forte preferência por ácidos graxos que contêm uma ligação dupla cis-9. Esta enzima seletiva a cis-9 pode ser aplicada na hidrólise ou esterificação do CLA, um ácido linolêico conjugado, uma mistura de ácidos octadecadienóicos que diferem na posição de sua ligação dupla conjugada. CLA tem recebido considerável atenção devido a suas propriedades anticarcinogênicas e antiaterogênica (Burket et al., 2004; Macedo et al., 1997).

5. Resolução biocatalítica de misturas racêmicas

Resolução de misturas racêmicas catalisadas por lipase pode ocorrer através da hidrólise assimétrica de ésteres correspondentes, em meio não-aquoso e pode ser estendida a reações estereoespecíficas de (trans)-esterificações. Neste caminho, compostos opticamente ativos para inseticidas têm sido obtidos por uma reação éster-hidrolítica usando lipase de *Arthrobacter* (Jaeger et al., 1994).

Zarevúcka et al. (2005) estudaram as propriedades enantioseletivas de lipases de *Geotrichum*. As lipases deste microrganismo foram usadas como biocatalisadoras para a resolução hidrolítica da mistura racêmica *cis*- ou *trans*-isômeros de 2-(4-metoxibenzil) ciclohexil acetatos, obtendo resultados satisfatórios.

A hidrólise assimétrica do ácido éster 3-fenilglicídico, o qual é intermediário na síntese do vasodilatador coronário hidroclorito de diltiazem tem sido desenvolvida através da lipase de *S. marcescens* (Jaeger et al., 1997).

6. Cosméticos e aromas

(-)-Metil jasmonato, um composto que atua como fator de crescimento em plantas, pode ser sintetizado através de uma reação catalisada pela Lipase P comercial (Amano) para produzir um intermediário quiral chave (+)-(6S)-metil 7-epicucurbate, o qual possui notas aromáticas (Jaeger e Eggert, 2002).

7. Substituinte de manteiga de cacau

A manteiga de cacau é um dos mais importantes constituintes na formulação do chocolate e é composto predominantemente (>70%) de trigliceróis simétricos, 1,3-dipalmitoil-2-oleoilglicerol (POP), 1,3-palmitoil-3(1)-estearoil-2-monoleína (POS) e 1,3-diestearoil-2-oleoilglicerol (SOS) com ácido oléico na posição sn-2.

Processos de interesterificação química para análogos de manteiga de cacau têm sido desenvolvidos através de gorduras e óleos de baixo custo. Devido a alta especificidade e eficiência em reações de intercâmbio de acil, as lipases atuam em reações de interesterificação na produção de análogos e algumas gorduras e óleos comercialmente baratos (Liu et al., 2006).

Lipases alcalinas

Um dos grandes problemas enfrentados pelas indústrias de alimentos que trabalham com produtos cárneos ou lácteos, é o tratamento de águas e efluentes contendo resíduos de gorduras (Allie et al., 2003; Mendes et al. 2005). Allie et al.

(2003) estudaram a eficiência de lipases e proteases no tratamento de águas residuais de matadouros, e mostraram que a aplicação destas enzimas auxiliou na remoção de flocos formados pela mistura de proteínas e gorduras provenientes do processamento de carne.

Um dos problemas associados à limpeza de roupas é a remoção de manchas de gorduras. Desta forma, sujeira contendo gordura é emulsionada e removida usando uma combinação de elevada temperatura e alcalinidade. Entretanto, há uma forte tendência do uso de baixas temperaturas na lavagem, próximas a 40°C, condições particularmente insuficientes para remoção de gorduras. Há desta forma uma necessidade de incluir aditivos em detergentes, como enzimas, que sejam efetivos em baixas temperaturas de lavagem, estáveis em soluções altamente alcalinas e sobre condições extremas da composição do detergente (Gerritse et al., 1998).

Um grupo particular de lipases tem recebido uma especial atenção nestes últimos anos, devido ao seu amplo potencial de aplicação na indústria, principalmente no que se diz respeito à formulação de detergentes. As lipases alcalinas têm a excelente característica de remover ácidos graxos na limpeza de maquinários, sob condições de temperaturas mais amenas, sem danificá-los (Rathi et al., 2001), como também reduzir os gastos com energia. Algumas lipases alcalinas com altos níveis de atividade em pHs alcalinos têm sido obtidas de vários microrganismos como *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., *Humicola* sp. e *Pseudomonas* sp. (Lin et al., 1996). Algumas destas linhagens pertencem ao grupo de microrganismos alcalinofílicos, os quais são caracterizados pelo seu ótimo crescimento em pH alcalino.

Outros estudos têm sido realizados para a aplicação de lipases em agentes de limpeza, como xampus, cremes e cremes dentais profiláticos. A importância destas enzimas em agentes de limpeza não resulta unicamente de sua alta eficiência, mas também por razões de proteção ambiental. Os fosfatos, que são usados em agentes sintéticos de limpeza, são conhecidos por poluir águas potáveis (Flipsen et al., 1998).

Novas lipases microbianas têm sido estudadas e caracterizadas bioquimicamente e os genes têm sido clonados e seqüenciados. A regulação da expressão do gene, os mecanismos de secreção, a estrutura 3D de lipases fúngicas e bacterianas têm sido o foco de muitos estudos (Rosenau e Jaeger, 2000).

Os genes de algumas lipases alcalinas de microrganismos têm sido isolados e caracterizados. O gene que codifica a principal lipase alcalina de *P. alcaligenes* foi isolado e caracterizado por Gueritise et al. (1998). A amplificação de cópias dos genes de lipase em *P. alcaligenes* com a adição de baixo e alto número de plasmídeos resultou no aumento da expressão que foi aparentemente colinear com o número de cópias do gene.

De modo geral, as lipases de *Pseudomonas* mostram características bioquímicas especiais em relação a lipases produzidas por outros microrganismos no que se diz respeito de sua termorresistência e atividade em pH alcalino. Os genes que codificam a lipase alcalina de *P. aeruginosa* têm sido clonados e seqüenciados (Rosenau e Jaeger, 2000; Jaeger et al., 1994). A superexpressão heteróloga em hospedeiros como a *Escherichia coli* facilita a produção de lipase enzimaticamente ativa propiciando os estudos dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação de sua expressão e secreção de lipase (Rosenau e Jaeger, 2000).

Tan e Miller (1992) identificaram um gene estrutural de lipase de *Pseudomonas fluorescens* B52. Eles utilizaram uma biblioteca genômica dentro do plasmídeo pUC19 para isolar e identificar o gene de lipase, o qual foi expresso em *E. coli*. A análise da seqüência de nucleotídeos revelou um “open reading frame” de 1.428 nucleotídeos que foi deduzido e codifica uma proteína com uma massa molecular de 50.241 Da. A predição da seqüência de aminoácidos desta enzima mostrou uma alta homologia com o possível domínio de ligação presente em todas as lipases examinadas em bancos de dados. A atividade lipolítica das colônias recombinantes foi medida pelo método de fluorescência usando 4-metilumbeliferona oleato como substrato, demonstrando que os transformantes continham atividade que aumentou com o tempo de cultivo das colônias.

Outra lipase de *Pseudomonas* sp. psicrotrófica (linhagem B11-1) foi clonada, purificada e caracterizada por Choo et al. (1998). A seqüência de aminoácidos deduzida pela seqüência de nucleotídeos do gene (924 bp) correspondeu a uma proteína de 308 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular de 33.714 Da. Esta enzima também possui um motivo “consensu” conservado em outras lipases de temperaturas baixas, como a da *Moraxella* TA144 da Antártica. A enzima expressa em *E. coli* mostrou atividade específica na posição 1,3 para trioleína. *p*-Nitrofenil ésteres com ácidos graxos de cadeia curta (C₄ e C₅) serviram como bons substratos. A enzima mostrou atividade ótima em pH próximo a 8 e estabilidade na faixa de pH 6-9, e de temperatura entre 5 e 35 °C.

Muitas lipases apresentam atividade ótima em pH neutro e em temperaturas por volta de 35-48 °C. Alguns poucos trabalhos têm sido realizados para obter lipases com elevada atividade em condições de lavagem, como pH alcalino (7-11) e altas temperaturas (acima de 60 °C) e na presença de detergentes aniônicos. A Novo Nordisk foi pioneira quando desenvolveu a lipolase[®] por engenharia genética e de proteína a partir do gene da lipase de *Humicola lanuginosa* e sua superexpressão em *A. oryzae*, produzindo uma enzima estável e ativa para utilização em detergentes (Pandey et al., 1999).

Alguns estudos têm sido realizados para a otimização de processos para aumentar a produção de lipase alcalina para detergentes. Rath et al. (2001) encontraram uma nova lipase alcalina de *Burkholderia cepacia*. Os autores utilizaram vários parâmetros físico-químicos para otimizar a produção máxima desta enzima em *B. cepacia*. O meio de crescimento para produção desta enzima foi óleo de mostarda (1% v/v) a 50 °C, pH 7,0 e 250 rpm. A lipase alcalina mostrou-se compatível com vários surfactantes iônicos e não-iônicos bem como com detergentes comerciais. A enzima manteve 100% de atividade na presença de oxidantes fortes (1% v/v ou 1% m/v), H₂O₂, perborato de sódio e hipoclorito de sódio após 1h de tratamento à temperatura ambiente. A enzima mostrou-se também resistente a várias proteases alcalinas comerciais, restando sua completa atividade após 1h de tratamento a 50 °C. A lipase exibiu melhor estabilidade em detergentes comerciais e agentes

oxidantes quando comparada à Lipolase® (“lipase detergente” produzida pela Novo Nordisk, Denmark).

Referências Bibliográficas

1. ADM Kao LLC, Decatur, IL, USA. Available from <www.enovaoil.com>.
2. Alewijn, M.; Sliwinski, E.L.; Wouters, J.T.M. Production of fat-derived (flavour) compounds during the ripening of Gouda cheese. **International Dairy Journal**, v.15, p.733-740, 2005.
3. Allie, Z.; Jacobs, E.P.; Maartens, A.; Swart, P. Enzymatic cleaning of ultrafiltration membranes fouled by abattoir effluent. **Journal of Membrane Science**, v.218, p. 107-116, 2003.
4. Arpigny, J.L. and Jaeger, K.-E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemistry Journal**, v. 343, p.177-183, 1999.
5. Bornscheuer, U.T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.73-81, 2002.
6. Burket, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p.77-84, 2004.
7. Choo, D-W.; Kurihara, T.; Suzuki, T.; Sada, K.; Esaki, N. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. Strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.2, p.489-491, 1998.

8. Costa, M. C. Produção, purificação e caracterização de lipase de *Aspergillus* sp. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1996.
9. Costa, V. S. R. Produção, purificação e caracterização de lipase de uma nova linhagem de *Rhizopus* sp. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1997.
10. Davranov, K. Microbial lipases in biotechnology (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.30, n.4-5, p.427-432, 1994.
11. Du, W.; Xu, Y.-Y.; Liu D.-H.; Li, Z.-B. Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.37, p.68-71, 2005.
12. Eggert, T.; van Pouderoyes, G.; Pencreac'h, G.; Douchet, I.; Verger, R.; Dijkstra, B.W.; Jaeger, K.-E. Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.26, p.37-46, 2002.
13. Flipsen, J.A.C.; Appel, A.C.M.; van der Hijden, H.T.W.M.; Verrips, C.T. Mechanism of removal of immobilized triacylglycerol by lipolytic enzymes in a sequential laundry wash process. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, p.274-280, 1998.
14. Fuciños, P.; Domínguez, A.; Sanromán, A.; Longo, M.A.; Rúa, M.L.; Pastrana, L. Production of thermostable lipolytic activity by *Thermus* species. **Biotechnology Progress**, v. 21, p.1198-1205, 2005.
15. Gentili, A.; Curini, R.; Cernia, E.; D'Aacenzo, G. Thermal stability and activity of *Candida cylindracea* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.3, p.43-49, 1997.

16. Gerritse, G.; Hommes, R. W. J.; Quax, W. J. Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.7, p.2644-2451, 1998.
17. Gill, J. and Parish, J.H. Minireview: lipases – enzymes at an interface. **Biochemical Education**, v.25, n.1, p.2-5, 1997.
18. Guo, Z. and Sun, Y. Solvent-free production of 1,3-diglyceride of CLA: strategy consideration and protocol design. **Food Chemistry**, 2005 (Article in Press).
19. Holmquist, M.; Tessier, D.C.; Cygler, M. Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* lipases I and II. **Biochemistry**, v.36, p.15019-15025, 1997.
20. Hoshino, T.; Sasaki, T.; Watanabe, Y.; Nagasawa, T.; Yamane, T. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.56, n. 4, p.660-64, 1992.
21. Jaeger, K.-E.; Ransac, S.; Dijkstra, B.W.; Colson, C.; van Heuvel, M.; Misset, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p.29-63, 1994.
22. Jaeger, K.-E.; Schneidinger, B.; Rosenau, F.; Werner, M.; Lang, D.; Dijkstra, B.W.; Schimossek, K.; Zonta, A.; Reetz, M.T. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.3, p.3-12, 1997.
23. Jaeger, K.-E. and Reetz, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **TIBTECH**, v.16, p.396-403, 1998.
24. Jaeger, K.-E.; Dijkstra, B.W.; Reetz, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p.315-351, 1999.

25. Jaeger, K.-E. and Eggert, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p.390-397, 2002.
26. Kennedy, M.B. and Lenarz, W.J. Characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* and its relationship to a membrane-bound lipase found in a mutant strain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 4, p. 1080-1089, 1979.
27. Lin, S.-F.; Chiou, C.-M.; Yeh, C.-M.; Tsai, Y.-C. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n. 3, p.1093-1095, 1996.
28. Liu, K.-J.; Chang, H.-M.; Liu, K.-M. Enzymatic synthesis of cocoa butter analog through interesterification of lard and tristearin in supercritical carbon dioxide by lipase. **Food Chemistry**, 2006 (Article in Press).
29. Lin, E.-S. and Ko, H.-C. Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 261-265, 2005.
30. Macedo, G. A. Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações de lipase de *Geotrichum* sp. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1995.
31. Macedo, G.A. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.90-95, 1997.
32. Macedo, G.A., Pastore, G.M., Rodrigues, M.I. Optimizing the synthesis of isoamyl butyrate using *Rhizopus* sp. lipase with a central composite rotatable design. **Process Biochemistry**, v.39, p.687-692, 2004.

33. Martínez, A. and Soberón-Chávez, G. Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.56, p.31-735, 2001.
34. Melo, L.L.M.M.; Pastore, G.M.; Macedo, G.A. Optimized synthesis of citronellyl flavour esters using free and immobilized lipase from *Rhizopus* sp. **Process Biochemistry**, v.40, p.3181-3185, 2005.
35. Mendes, A.A. and Castro, H.F. Effect on the enzymatic hydrolysis of lipids from dairy wastewater by replacing gum arabic emulsifier for sodium chloride. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.135-142, 2005.
36. Nagao, T.; Shimada, Y.; Sugihara, A.; Tominaga, Y. Increase in stability of *Fusarium heterosporum* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.17, p. 125-132, 2002.
37. Nagao, T.; Shimada, Y.; Sugihara, A.; Tominaga, Y. Amino acid residues contributing to stabilization of *Fusarium heterosporum* lipase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 5, p. 446-450, 2000.
38. Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Kriger, N.; Soccol. V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 29, p.119-131, 1999.
39. Rapp P. Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.832-838, 1995.
40. Rathi, P.; Saxena, R.K.; Gupta, R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. **Process Biochemistry**, v.37, p.187-192, 2001.
41. Rosenau, F. and Jaeger, K-E. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. **Biochimie**, v.82, p. 1023-1032, 2000.

42. Rotticci-Mulder, J. C.; Gustavsson, M.; Holmquist, M.; Hult, K.; Martinelle, M. Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain. **Protein Expression and Purification**, v.21, p. 386-392, 2001.
43. Simons, J-W. F. A.; Boots, J-W. P.; Slotboom, A. J.; Vweheij, H. M. The (phospho)lipase from *Staphylococcus hyicus*: Expression in *Escherichia coli*, large-scale purification and application in esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.3, p.13-23, 1997.
44. Soberon Lozano, M. M. Estudo da propriedade de esterificação enantioseletiva de *Rhizopus* sp. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2001.
45. Souza Neto, R. Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações da lipase de *Alcaligenes* sp. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1996.
46. Tan, Y. and Miller, K. J.; Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n. 4, p.1402-1407, 1992.
47. Zarevúcka, M.; Kejík, Z.; Saman, D.; Wimmer, Z.; Demnerová, K. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p. 481-486, 2005.

CAPÍTULO 1: Seleção de microrganismos produtores de lipase alcalina extracelular

RESUMO

Recentemente, a aplicação industrial de lipases microbianas tem sido estendida a muitas áreas, como por exemplo, o seu uso em modificação de triglicerídeos, síntese de vários compostos de éster e detergentes domésticos. A lipase microbiana usada em cada aplicação é selecionada baseada em suas propriedades enzimáticas. Para isolar um novo microrganismo produtor de lipase para detergente, foi realizada uma seleção de microrganismos de amostras de frutas e solo do Nordeste do Brasil e o fungo *Fusarium oxysporum* (cepa de número 152B) foi escolhido por produzir a maior quantidade de lipase alcalina extracelular em meio de cultura entre todos os 216 microrganismos estudados. Neste trabalho, foi descrita a identificação do *F. oxysporum* através dos métodos taxonômico tradicional e molecular.

Palavras-chaves: Lipase alcalina; seleção de microrganismos; identificação.

Screening of microorganisms producing extracellular alkaline lipase

ABSTRACT

Recently, industrial application of the microbial lipases has been extended in many areas, exemplified by their use in modification of triglycerides, synthesis of various ester compounds and in household detergents. The microbial lipase used in each application is selected based on its enzymatic properties. To isolate new lipase-producing microorganism for detergents, it was carried out a screening from fruit and soil samples from Northeast of Brazil and found one strain *Fusarium oxysporum* (strain number 152B) which produced the largest amount of extracellular alkaline lipase in the culture media of all 216 microorganisms isolated. In this work, it was also described the *F. oxysporum* identification using traditional taxonomic and molecular methods.

Keywords: Alkaline lipase; microorganism screening; identification.

INTRODUÇÃO

Lipases (EC 3.1.1.3) hidrolisam triacilgliceróis a ácidos graxos e glicerol. Embora as lipases sejam amplamente distribuídas na flora e na fauna, elas são mais abundantemente encontradas na flora microbiana compreendendo as bactérias, fungos e leveduras. As enzimas microbianas apresentam um grande potencial para aplicações comerciais devido a sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade a diferentes substratos (Cardenas et al., 2001). Estas características permitem que as lipases sejam empregadas em indústrias como alimentos, farmacêuticas, detergentes, tecidos, biodiesel, cosméticos e síntese de química fina (Kumar et al., 2005). As lipases microbianas têm sido usadas para a produção de aromas desejáveis em queijos (Alewijn et al., 2005); desenvolvimento de compostos de aroma em produtos lácteos e bebidas (Jaeger et al., 1999); para a interesterificação de gorduras e óleos para produzir acilgliceróis, que não são obtidos por interesterificação química convencional (Pandey et al., 1999).

Um grande crescimento tecnológico tem sido observado para os detergentes biológicos. Lipases, proteases, amilases e celulasas são adicionadas aos detergentes onde elas podem catalisar a quebra de ligações químicas com a adição de água. Lipases são geralmente adicionadas aos detergentes primariamente em combinação com proteases e celulasas. Atualmente, elas são extensivamente usadas em detergentes caseiros, para limpezas industriais e processamento de couro (Pandey et al., 1999).

Neste trabalho, foi realizada a busca por uma nova lipase alcalina extracelular microbiana para aplicação em detergentes. Para isso, foram escolhidos vários microrganismos, fungos, leveduras e bactérias, de amostras de solo e frutas do nordeste brasileiro, especialmente oriundas dos estados de Alagoas e Sergipe. O isolamento destes microrganismos ocorreu em meio alcalino contendo óleo de oliva para a seleção de cepas produtoras de lipases estáveis a condições extremas de pH.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Os microrganismos foram isolados e selecionados a partir de amostras de frutas e solo do litoral do nordeste brasileiro (Alagoas e Sergipe).

Para o cultivo e isolamento dos microrganismos, as amostras de frutas e solo foram diluídas em 10 mL de água destilada estéril, homogeneizadas e deixadas em repouso por 30 min aproximadamente. O líquido sobrenadante foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura esterilizados, compostos de meio PDA (Ágar batata dextrose) ou YM (% m/v em água destilada) peptona 0,5; glicose 1,0; extrato de levedura 0,3; extrato de malte 0,3 e ágar 2,0.

Seleção de microrganismos produtores de lipase

O meio de cultivo em placa de petri para seleção de microrganismos produtores de lipase foi constituído de: (% m/v em água destilada) óleo de oliva 2,0; peptona 0,3; extrato de levedura 0,2; K_2HPO_4 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1; Na_2CO_3 0,1; ágar 2,0; Rhodamina B 0,001 (Lin et al., 1995). Os microrganismos foram incubados a 30 °C por 96 h. Foram consideradas colônias produtoras de lipase extracelular aquelas que formaram um halo claro ao seu redor, devido à hidrólise do óleo de oliva, e estas foram selecionadas e mantidas a 4 °C em tubos contendo meio PDA (Ágar batata dextrose).

Seleção de microrganismos em meio líquido

Os microrganismos selecionados foram cultivados por 96 h, a 30 °C em tubo inclinado contendo meio sólido (% m/v em água destilada): glicose 1,0; peptona 0,3; extrato de levedura 0,2; K_2HPO_4 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1; Na_2CO_3 0,1; ágar 2,0. Em seguida, foi adicionado 10 mL de água destilada estéril em cada tubo, e a

superfície do meio raspada com alça de níquel. Deste conteúdo, 1 mL foi transferido para frascos Erlenmeyer de 100 mL contendo 20 mL de meio líquido (% m/v em água destilada) contendo óleo de oliva 1,0; peptona 1,5; extrato de levedura 0,5; K_2HPO_4 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,04; Na_2CO_3 1; Triton X-100 0,2. A fermentação ocorreu a 30 °C, à 160 rpm. Após 24 h, 1 mL do meio de cultivo foi transferido para um novo meio de cultura, e incubado por mais 48 h. Os meios de cultivo foram rapidamente resfriados a 4 °C e as células removidas por filtração usando filtro Whatman (Grade 42 – Ashless Quantitative Filter) (modificado de Lin et al., 1995).

Determinação da atividade lipolítica

Para a medida da atividade lipolítica foi usada uma emulsão preparada com 75 mL de goma arábica 7% e 25 mL de óleo de oliva (Azeite “Gallo”, Victor Guedes, Ind. e Com., S.A., Portugal), homogeneizados em liquidificador por 2 min. Foram usados 3 frascos Erlenmeyers de 50mL para cada reação contendo 4 mL de tampão fosfato 20 mM, pH 9,0; 1 mL de $CaCl_2$ 110mM; 5 mL de emulsão; 1 mL da solução enzimática (sobrenadante do meio de cultura). Os Erlenmeyers foram incubados em banho com agitação a 160 rpm, 37°C durante 20 min. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de acetona:etanol (1:1), permanecendo ainda no banho com agitação por mais 5 min (Macedo et al., 1997).

O teste em branco como controle consistiu de 15 mL da mistura de acetona:etanol (1:1) adicionados antes da solução enzimática, de maneira que a enzima não atuasse na reação.

Os ácidos graxos produzidos foram titulados com NaOH 0,05 M usando 20 µL de fenolftaleína (0,5% em etanol) como indicador.

Uma unidade de lipase (1U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um µmol de ácido graxo por minuto ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$), nas condições descritas acima.

Identificação taxonômica de fungos

Para identificação em nível de gênero, foram utilizados os meios padrões descritos por Pitt e Hocking (1999). A chave de identificação neste livro baseia-se em inocular as colônias e crescê-las por sete dias em três meios padrões a 25 °C, e um destes também a 5 e 37 °C. Estes três diferentes meios são: Extrato de levedura Czapek agar (CYA), em três temperaturas; Extrato de malte agar (MEA) e 25% Glicerol nitrato agar (G25N). Quando finalizados os sete dias de crescimento, as colônias foram medidas (diâmetro de crescimento em milímetros) e através de uma chave de identificação, o gênero do fungo foi determinado.

Para visualização em microscópio, o fungo foi incubado em meio PDA (Ágar batata destrose) em microcultivo por até 4 dias, e corado com Azul de Metileno.

Identificação de espécies de *Fusarium* através de técnicas moleculares

Extração de DNA genômico

O DNA do micélio do *Fusarium* foi extraído usando o método do brometo *N*-cetil-*N,N,N*,-timetilamônio (CTAB) através do kit “Genomic DNA from Plant - Support protocol for fungi” (Macherey-Nagel®, Alemanha, Out/2003 – Rev. 01). A concentração de DNA foi determinada espectrofotometricamente pela leitura da absorbância a 260 nm. Uma medida de absorbância (O.D.) igual a 1,000 equivale 50 ng/μL de DNA.

As amostras de DNA foram analisadas em gel de 0,8% (m/v) e observadas através da “coloração” com brometo de etídeo, sob luz UV.

Reação da cadeia da polimerase (PCR)

Após a extração do DNA, este foi amplificado por reação de PCR, utilizando uma Taq DNA polimerase. A reação procedeu com 5 µL de tampão da enzima concentrado 10x, 1 µL da mistura dos 4 dNTPs 10 mM, 1 µL do oligonucleotídeo “sense” 10 pmol/µL, 1 µL do oligonucleotídeo “antisense” 10 pmol/µL, 1 µL de DNA e 0,2 µL da enzima Taq DNA Polymerase, para um volume final de 50 µL. O programa da reação de PCR foi 94 °C por 15 minutos, seguido de 41 ciclos (94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento dos oligos por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos), 72 °C por 15 minutos, terminando com 4 °C ∞. A eficiência e o tamanho do DNA amplificado foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA).

As reações de amplificação foram desenvolvidas usando os seguintes pares de oligonucleotídeos (Tabela 1).

Tabela 1: Seqüência dos oligonucleotídeos e temperatura de anelamento para amplificação por PCR.

Oligonucleotídeos ^a	Seqüências	Temperatura de anelamento (°C)
ITS 1_for	5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'	52
ITS 4_rev	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	

^a Duggal et al., 1997.

Clonagem dos produtos de PCR

Após a amplificação dos DNAs, estes foram isolados em gel de agarose 1,5%, e o fragmento de DNA correspondente foi purificado utilizando-se um kit de extração “MinElute Handbook” (QIAGEN). Após purificação, o fragmento de DNA foi inserido, no plasmídeo pCR[®] 2.1 (Invitrogen) utilizando-se o kit “TA cloning”

(Invitrogen). Após ligação do fragmento de DNA ao plasmídeo, este material foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli*, segundo as orientações contidas neste mesmo kit. As bactérias que continham os plasmídeos recombinantes foram selecionadas em meio de cultura LB sólido contendo ampicilina e X-Gal, segundo Sambrook et al. (1989).

Extração de DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada através do kit Plasmid DNA Purification (MACHEREY-NAGEL). Para isso, as colônias, prováveis recombinantes, foram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina e incubadas “overnight” a 37°C, em agitação de 300 rpm. Após incubação, a extração do DNA plasmidial procedeu segundo as orientações contidas neste kit, e o DNA analisado em gel de agarose 0,8%. A concentração do DNA foi determinada espectrofotometricamente e então o mesmo foi enviado para seqüenciamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e seleção

O uso de meios sólidos suplementados com triglicerídeos emulsificados é uma metodologia padrão para a seleção de microrganismos produtores de lipases (Cardenas et al., 2001). Um total de 216 microrganismos foi isolado em meio PDA (Potato Dextrose Agar) e YM (Yeast Malt Agar). Após o isolamento, estas cepas foram inoculadas em meio alcalino sólido com Rodamina B para seleção de microrganismos produtores de lipase alcalina. Após incubação de 96 h, as placas de meio com Rodamina B foram analisadas com os seguintes critérios: (1) microrganismos que não cresceram; (2) cresceram, mas não produziram halo de hidrólise; (3) produziram halo de hidrólise de diferentes intensidades, classificados entre halos de intensidade 1 a 6. A Figura 1 mostra o padrão de crescimento dos

microrganismos no meio alcalino contendo Rodamina B e o padrão de hidrólise do óleo de oliva no meio. Como se pode observar quase metade dos microrganismos isolados não cresceu neste meio. Isto provavelmente ocorreu porque este meio é extremamente alcalino, ao redor de pH 10,0. Por outro lado, apenas 12% dos microrganismos cresceram neste meio e não produziram halo de hidrólise. Dos 216 microrganismos, 46% produziram halo de hidrólise, indicando que estes microrganismos produziram lipase extracelular.

Alguns trabalhos reportam que a produção de lipase extracelular aumenta com a adição de óleo de oliva (Rapp, 1995). Destes 46% de microrganismos que produziram halo de hidrólise pode ter sido devido a indução pelo óleo de oliva presente no meio (neste caso usado como substrato, mas que pode ter agido como indutor). A diferença de intensidade entre halos de hidrólise pode ser provavelmente devido a quantidade de lipase extracelular excretada pelo microrganismo, e/ou também pela estabilidade da enzima em pH alcalino.

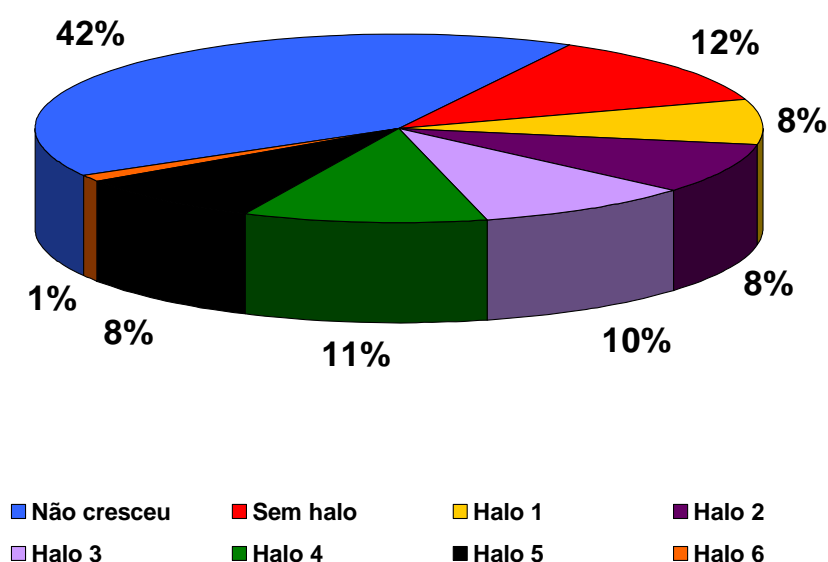


Figura 1: Padrão de crescimento e de halo de hidrólise produzido em meio alcalino com Rodamina B abordado em porcentagem.

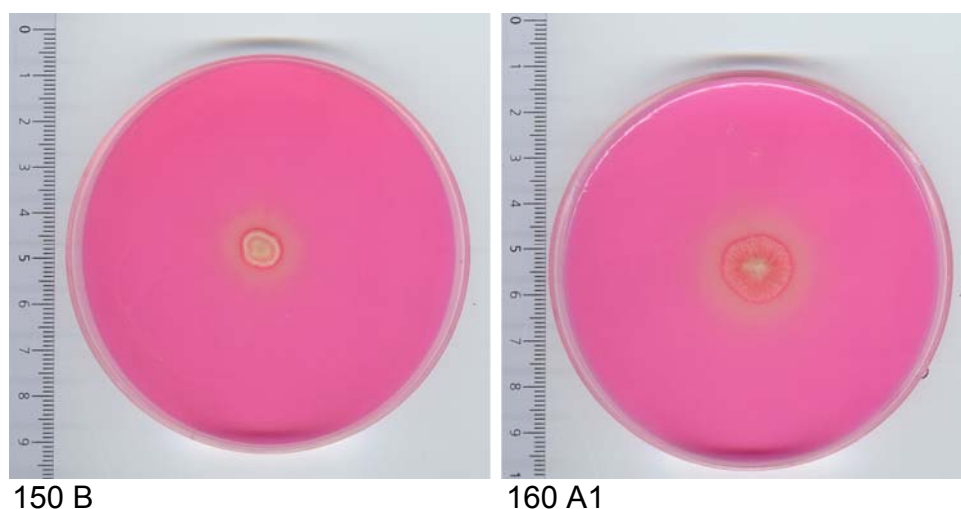


Figura 2: Exemplos de halos de hidrólise produzidos pelas cepas de número 150 B e 160 A1 após 96 h de crescimento em meio alcalino com Rodamina B.

Após seleção em meio alcalino sólido com Rodamina B, 72 microrganismos foram avaliados quanto a produção de lipase em meio alcalino líquido. Ocorreu uma grande variação na intensidade de lipase alcalina extracelular produzida. Como mostrado na Figura 3, não há uma correlação entre o tamanho de halo produzido em meio sólido com a produção de lipase alcalina em meio líquido. Por outro lado, a maior produção de lipase alcalina ocorreu entre os microrganismos classificados no grupo de halo de intensidade 4. Deste grupo, apenas dois microrganismos, cepas de número 152 B e 160 A1 foram selecionados devido a maior atividade lipolítica produzida, 11,56 e 10,56 U/mL, respectivamente.

Identificação taxonômica de fungos

A chave taxonômica utilizada para identificar o fungo isolado (152B) está contida no livro de Pitt e Hocking (1999). Após o isolado 152B crescer por sete dias em três diferentes meios padrões CYA, MEA e G25N nas temperaturas indicadas, os diâmetros das colônias foram medidos em milímetros e através destas informações, seguiu-se a identificação através da chave taxonômica. A Figura 4 mostra o padrão das colônias 152B crescidas nos três meios.

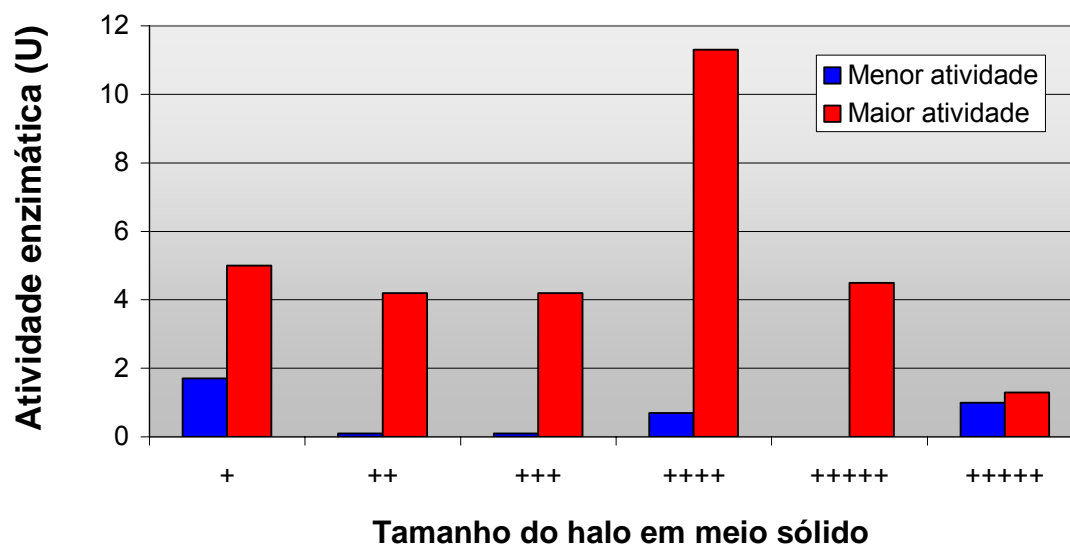


Figura 3: Correlação entre as intensidades de halos de hidrólise produzidas pelas cepas em meio sólido e a produção de lipase alcalina em meio líquido.

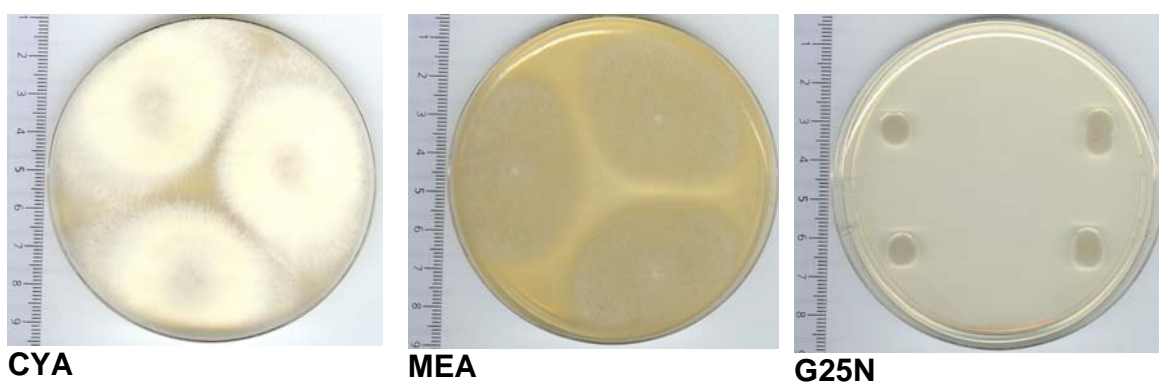


Figura 4: Colônias do fungo 152B crescidas nos meios padrões CYA, MEA e G25N como descrito por Pitt e Hocking (1999).

Observação: estas fotos foram tiradas com mais do que 7 dias de crescimento, mas as medidas das colônias (Tabela 2) foram feitas nos exatos 7 dias, como segue o protocolo de identificação.

Tabela 2: Medidas dos diâmetros das colônias do fungo 152B crescidas nos meios padrões CYA, MEA e G25N, como descrito por Pitt e Hocking (1999).

Meios	CYA	MEA	G25N
Crescimento*	+	+	+
Diâmetro (mm)	270	350	2

* Cresceu (+); Não cresceu (-)

Seguindo a chave taxonômica, observando o crescimento das colônias 152B e a morfologia através de microscopia, chegou-se a conclusão que esta linhagem pertence ao gênero *Fusarium*.

Por morfologia observada em microscópio, o fungo *Fusarium* foi identificado como *Fusarium oxysporum* (Figura 5). Segundo Hoog e Guarro (2001) a espécie *F. oxysporum* apresenta monofilíades laterais em micélio aéreo (Figura 5 A e B); macroconídeos fusiformes, levemente curvados, pontudos no ápice, 3(-5)-septos e microconídeos abundantes (Figura 5C); em contraste ao *F. solani* as filíades são pequenas e muitas vezes não septadas (Figura 5 A e B).

A identificação da espécie do fungo *Fusarium* foi realizada com a colaboração da Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber, da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

As espécies de *Fusarium* fazem parte de um grupo diverso, cosmopolitano de fungos responsáveis por numerosas doenças de plantas, apodrecimento, toxidade e micoses humanas e de animais. Atualmente, os principais esquemas de classificação são baseados nas características dos esporos que crescem em meios especiais juntamente com microanatomia. Algumas chaves taxonômicas têm sido desenvolvidas para acomodar estes critérios. Contudo, devido a plasticidade e integração dos caracteres fenotípicos, *Fusarium* mantém muitas mudanças sistemáticas entre os fungos, e com grande dificuldade de identificação (Duggal et al., 1997).

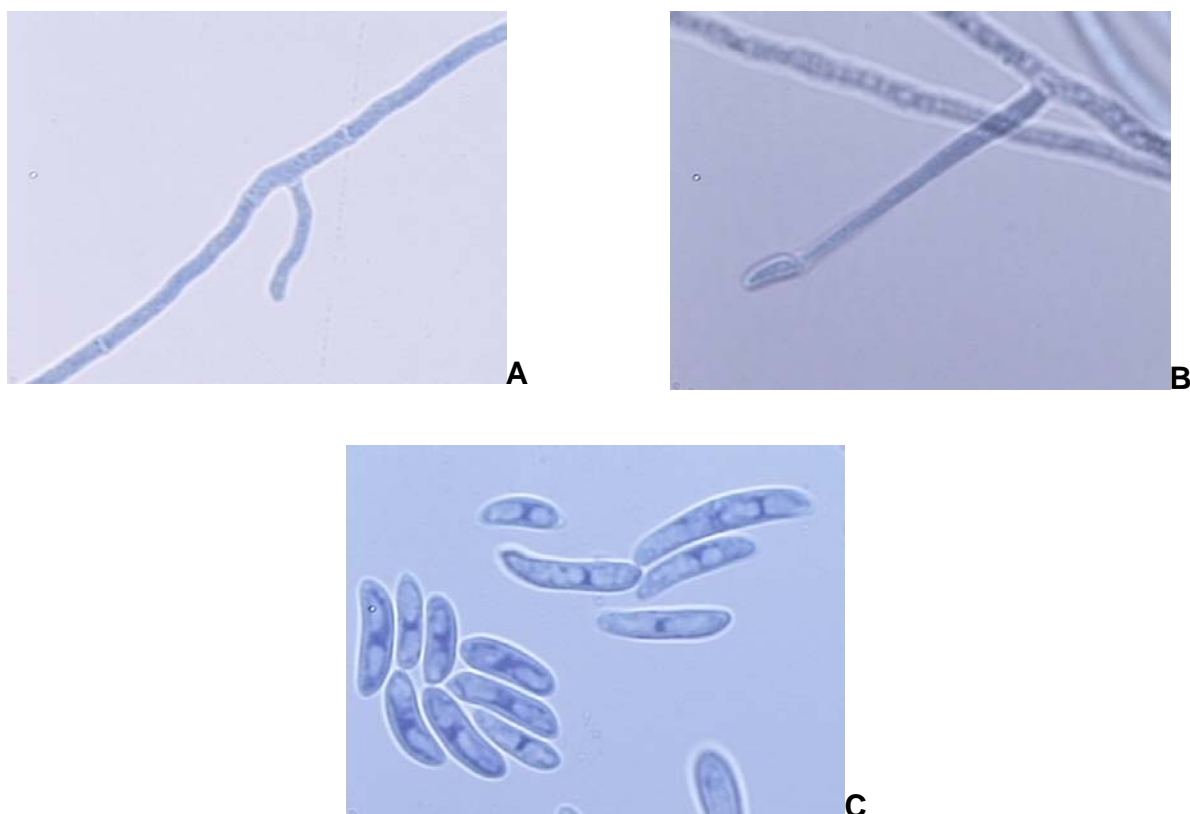


Figura 5: Fotos de microcultivo do *Fusarium oxysporum*; aumento de 1000x. **A e B:** monofilíades; **C:** macro- e microconídeos.

Ferramentas de diagnóstico molecular têm sido desenvolvidas nas últimas décadas. As técnicas baseadas em PCR (Reação de cadeia da polimerase) podem prover oligonucleotídeos espécie específicos, e um poderoso método diagnóstico para distinguir fungos nível espécie (Mulè et al., 2004). Das técnicas moleculares disponíveis, a análise das regiões repetidas do gene ribossomal tem sido especialmente usada. Os genes dos ribossomos 18S e 28S são utilizados para estimar as relações filogenéticas entre os organismos taxonomicamente diversos. Em contraste, a região ITS (Internal Transcribed Spacer) mostra muito mais divergência, e é usada para comparar organismos relativamente mais próximos (Duggal et al., 1997). Kulik et al. (2004) utilizaram reações de PCR e seqüenciamento para detectar espécies de *Fusarium sporotrichioides* em plantas baseado na seqüência de nucleotídeos da região ITS2. Eles amplificaram um fragmento de 288 bp contendo uma porção da ITS2 e do rDNA 28S dos isolados de

F. sporotrichioides e verificaram que este método desenvolvido pode ser útil para uma rápida identificação desta espécie de *Fusarium* em meio de cultura e tecidos vegetais.

Para confirmação das identificações por taxonomia e morfologia, foram realizadas técnicas moleculares, através de reações de PCR e seqüenciamento. Os oligonucleotídeos ITS 1_for e ITS 4_rev foram utilizados para amplificar o DNA extraído do micélio do fungo 152B. A Figura 6 mostra a amplificação de um fragmento de cerca de 550 bp, enquanto o controle positivo apresentou um fragmento de cerca de 700 bp.

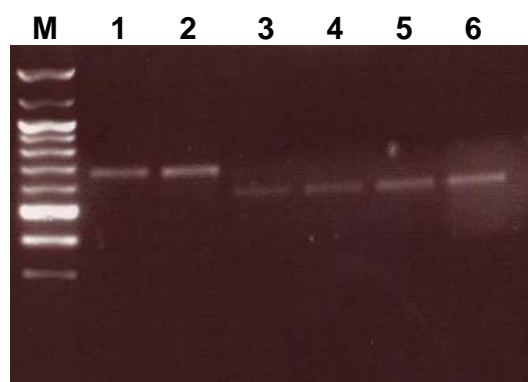


Figure 6: Produtos da amplificação com os oligonucleotídeos ITS 1 e ITS 4.

M: 100bp DNA Ladder (*New England Biolabs, Inc.*); **1 e 2:** DNA controle, 0,2 e 0,5 μ L de DNA molde usado na reação, respectivamente; **3 a 6:** DNA do fungo 152B, 0,2; 0,5; 1,0 e 3,0 μ L de DNA molde usado na reação, respectivamente.

Este fragmento de 550 bp foi ligado a um vetor de clonagem, pCR 2.1, e então transformado em células de *E. coli*, para preparação do DNA plasmidial em concentração suficiente para seqüenciamento. Após extração do DNA plasmidial, este foi enviado para seqüenciamento, e o resultado da seqüência está apresentado na Figura 7.

Foi utilizado o programa Blastn (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), que realiza alinhamentos entre seqüências de nucleotídeos-nucleotídeos, e fornecem alguns dados estatísticos sobre o grau de similaridade encontrada entre as seqüências.

Os alinhamentos são realizados através de uma procura pela base de dados dos programas originais do "BLAST". Os "scores" são pontuações dadas aos alinhamentos entre as seqüências comparadas. Quanto maior forem os "scores", melhores serão os alinhamentos. O primeiro critério de pontuação é um alinhamento sem "gaps", que consiste simplesmente em um par de segmentos de comprimento iguais, uma de cada uma das duas seqüências que estão sendo comparadas. O outro critério corresponde às bases que não se diferem entre os alinhamentos. A somatória das pontuações apresentadas a estes critérios determina o "score". Para analisar o quão alto um "score", é provável ser alto por acaso, um modelo de seqüências aleatórias é necessário.

O "E-value" é outro valor estatístico dado para a análise dos alinhamentos feitos pelo "Blast". Através do "E-value" é possível avaliar o quão similares são as seqüências alinhadas. Quanto menor exponencialmente for o "E-value", maior a similaridade entre as seqüências.

```
NANNTGGTACGAGCTNGGANCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCA
TTACCGAGTTATACAACCTCATCAACCCTGTGAACATACCTAAAACGTTGCTTCGGCGGGAACAGACGGCCCTGTAACAACG
GGCCGCCCCCGCCAGAGGACCCCTAACTCTGTTTTTATAATGTTTTTCTGAGTAAACAAGCAAATAAATTAAAACTTTCAA
CAACGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACAACCCTCAGGCCC
CCGGGCCTGGCGTTGGGGATCGGCGGAAGCCCCCTGTGGGCACACGCGTCCCTCAAATACAGTGGCGGTCCCGCCGCAGC
TTCCATTGCGTAGTAGCTAACACCTCGCAACTGGAGAGCGGCGCGCCATGCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAATGTTGAC
CTCGAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACA
CTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTGCCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTT
ACAACGTCGTGACTGGGAAAA
```

Figura 7: Resultado do seqüenciamento do fragmento proveniente da amplificação do DNA do fungo 152B.

O resultado do alinhamento da seqüência amplificada do fungo 152B (Figura 8) apresentou identidade com ambas as espécies, *F. solani* e *F. oxysporum*. Apesar do "Score" ser um pouco maior para a espécie *F. solani*, deve-se considerar que: 1. apenas um seqüenciamento foi realizado (o melhor é ter pelo menos mais uma repetição do seqüenciamento para excluir a possibilidade de enganos durante este procedimento); 2. há uma pequena probabilidade de erro de amplificação durante

as reações de PCR; 3. e obviamente não excluir os conhecimentos da taxonomia tradicional. Por estes motivos, permaneceu-se a identificação como *F. oxysporum*.

Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value
gi 53125472 emb AJ608989.1	Fusarium solani 5.8S rRNA gene, 2...		1116	0.0
gi 21666882 gb AF455451.1	Nectria haematococca isolate wb394...		1088	0.0
gi 4512119 gb AF129104.1 AF129104	Nectria haematococca 18S ri...		1049	0.0
gi 20339272 emb AJ317959.1 NHA317959	Nectria haematococca (li...		1043	0.0
gi 60593127 gb AY928418.1	Fusarium oxysporum isolate FO-11 1...		1023	0.0
gi 60593119 gb AY928410.1	Fusarium oxysporum isolate FO-03 1...		1007	0.0
gi 56578581 gb AY819045.1	Fusarium solani f. radicicola 18S ...		1007	0.0
gi 32264972 gb AY310442.1	Nectria haematococca 18S ribosomal...		1003	0.0
gi 50313401 gb AY667486.1	Fusarium oxysporum isolate 12-148 ...		995	0.0
gi 38503525 gb AY429049.1	Chaetomium globosum isolate Cg2 18...		965	0.0

Figura 8: Resultado do alinhamento da seqüência do fungo 152B (Figura 6) através do Programa Blast n.

CONCLUSÕES

De um total de 216 microrganismos isolados de frutas e solo do nordeste brasileiro, apenas dois produziram grande atividade lipolítica em meio líquido. Isto mostra o quão árduo é um trabalho de isolamento e seleção de microrganismos para produção de uma enzima com as características desejadas.

A cepa de número 152 B foi identificada como *Fusarium oxysporum* através de análise morfológica, crescimento em meios padrões e por biologia molecular. Este trabalho mostra que estas duas ferramentas devem ser complementares uma a outra na identificação, e que a biologia molecular, apesar de sua alta sensibilidade e qualidade, não exclui a avaliação morfológica de um microrganismo por um profissional com grande experiência.

Um trabalho de avaliação das variáveis que interferem na produção de lipase por este microrganismo deve ser realizado para melhorar a produção desta enzima em meio líquido para se tornar potencialmente interessante para aplicações industriais. Em conjunto a isso, as características físico- e bioquímicas desta lipase devem ser avaliadas quanto a sua aplicação.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber, da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, por auxiliar na identificação morfologia da espécie de *Fusarium oxysporum*. Ao Prof. Dr. Ralf Berger, da Universidade de Hanover, Alemanha, por prover materiais e ferramentas para as técnicas moleculares de identificação. Ao apoio financeiro provido pelo CNPq e RECOPE/Finep.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alewijn, M., Sliwinski, E.L., Wouters, J.T.M. Production of fat-derived (flavour) compounds during the ripening of Gouda cheese. **International Dairy Journal**, v. 15, p.733-740, 2005.
2. Cardenas, F., Alvarez, E., de Castro-Alvarez, M.-S., Sanchez-Montero, J.-M., Valmaseda, M., Elson, S.W., Sinisterra, J.-V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.14, p.111-123, 2001.
3. Duggal, A., Dumas, M.T., Jeng, R.S., Hubbes, M. Ribosomal variation in six species of *Fusarium*. **Mycopathologia**, v.140, p.35-49, 1997.
4. Hoog, G.S. and Guarro, J. Atlas of Clinical Fungi. Editado por Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Baarn e Delf, Holanda, 2001.
5. Jaeger, K.-E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v.53, p.315-351, 1999.

6. Kulik, T., Fordonski, G., Pszczółkowska, A., Plodzien, K., Lapinski, M. Development of PCR assay based on ITS2 rDNA polymorphism from the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides*. **FEMS Microbiology Letters**, v.239, p.181-186, 2004.
7. Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S., Gupta R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expression and Purification**, v.41, p.38-44, 2005.
8. Lin, S.-F., Chiou, C.-M., Tsai, Y.-C. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Biotechnology Letters**, v.17, p.956-962, 1995.
9. Macedo, G.A., Park, Y.K., Pastore, G.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Revista de Microbiologia**, v.28:90-95, 1997.
10. Mulè, G., Susca, A., Stea, G., Moretti, A. Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, p.235-240, 2004.
11. Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.29, p.119-131, 1999.
12. Pitt, J.I. and Hocking, A.D. Fungi and food spoilage – segunda edição. Aspen Publishers, United Kingdom, 1999.
13. Rapp P. Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p.832-838, 1995.
14. Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning – A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, San Diego, CA, 1989.
15. National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, May, 2006.

CAPÍTULO 2: Fatores que afetam a produção de lipase alcalina extracelular por *Fusarium oxysporum*

RESUMO

A produção de lipase depende da composição do meio de cultura e das condições da fermentação. Os efeitos da composição do meio, pH e temperatura foram investigados para a produção de lipase alcalina de *Fusarium oxysporum*. A quantidade máxima de atividade lipolítica produzida foi 7,12 U.mL⁻¹ em meio contendo óleo de oliva, peptona e extrato de levedura como fontes de carbono e nitrogênio, em pH 10,0 e 30 °C. Um desenho experimental 2² com configuração estrela, totalizando 11 experimentos, foi desenvolvido para estudar os efeitos do pH e temperatura de incubação. De acordo com as respostas do desenho experimental, os efeitos de cada variável foram calculados e as interações entre elas determinadas. Um modelo codificado foi usado para gerar uma superfície de resposta para a análise dos efeitos das variáveis sobre a atividade lipolítica e o máximo de atividade encontrada foi em pH 6,0 e a 30 °C (33 U.mL⁻¹). Um segundo desenho experimental 2² foi desenvolvido para estudar duas variáveis, composição do meio e a concentração de óleo de oliva. Máxima atividade enzimática foi produzida em meio de cultura suplementado com óleo de oliva (2% m/v).

Palavras-chaves: Lipase alcalina, *Fusarium oxysporum*, produção de enzima, desenho experimental.

Trabalho submetido a Revista Biotechnology Research em Março de 2006.

Factors affecting extracellular alkaline lipase production by *Fusarium oxysporum*.

ABSTRACT

Lipase production depends on the medium composition and condition of the fermentation medium. The effects of medium composition, pH and incubation temperature conditions were investigated to alkaline lipase production by *Fusarium oxysporum*. The maximum amount of lipolytic activity produced was 7.12 U.mL⁻¹ in medium containing olive oil, peptone and yeast extract, as carbon and nitrogen sources, at pH 10.0 and 30 °C. A 2² factorial design with star configuration, totaling 11 experiments, was carried out to study the effect of pH and incubation temperature conditions. According to the responses from the experimental designs, the effects of each variable were calculated and the interactions between them were determined. A coded model was used to generate a response surface for the analysis of the variable effects on lipase activity and the maximum lipase activity was found in pH 6.0 and 30 °C conditions (33 U.mL⁻¹). A second experimental design, 2² factorial was developed to study two variables, medium composition and olive oil concentration. Maximum enzyme activity was produced in culture medium supplemented with olive oil (2% w/v).

Keywords: Alkaline lipase, *Fusarium oxysporum*, enzyme production, factorial design.

INTRODUCTION

Lipases (triacyl glycerol ester hydrolase, E.C. 3.1.1.3) catalyze the hydrolysis of fats to monoglycerides, diglycerides, free fatty acids and glycerol. The reaction is reversible in micro-aqueous environments, under low water conditions it is found the reverse reaction (Gulati et al., 1999; Rathi et al., 2001). Microbial lipases have been used extensively in food, e.g. processing of fats and oils, hydrolysis, glycerolysis, esterification, alcoholysis/acidolysis, interesterification, flavour development in food and detergent industries (Pandey et al., 1999; Jaeger et al., 1994).

Lipases are very interesting and extremely versatile enzymes for the food industry since fats and oils are important constituents of food. The nutritional and sensory value and the physical properties of a triglyceride are greatly influenced by factors such as the positions of the fatty acid in the glycerol backbone, the chain length of the fatty acid and its degree of unsaturation. Lipases allow us to modify the properties of lipids by altering the location of fatty acid chains in the glyceride and replacing one or more of fatty acids with new ones (Sharma et al., 2001). Direct esterification and transesterification reactions have been performed using lipases to produce tailored triglycerides and numerous flavour esters. For example, short chain citronellyl esters and isoamyl butyrate, volatile flavour compounds, can be synthesized by microbial lipase from *Rhizopus* sp (Macedo et al., 2003; Gerritse et al., 1998). Lipases are being widely used in industrial applications, such as in dairy and food manufacture, leather and detergent industry, production of cosmetics and organic synthesis reactions, especially reactions in non-aqueous media (Silva et al., 2005).

Each application requires unique properties with respect to specificity, stability, temperature, and pH dependence or ability to catalyze synthetic ester reactions in organic solvents (Kumar et al., 2005).

Thermophilic lipases show higher thermostability, higher activity at elevated temperatures, and often show more resistance to chemical denaturation, making

them promising tools in industrial and chemical process where relatively high reaction temperature and/or organic solvents are used (Castro-Ochoa et al., 2005).

One of the most persistent problems with laundry cleaning is the removal of fatty stains. A combination of high-temperature and high-alkalinity washing conditions can be used to emulsify and subsequently remove the fat-containing dirt. However, these conditions lead to damage of the fabric and they require the input of large amounts of energy. Alkaline lipases are very important enzymes in laundry detergent formulations. These enzymes improve the removal of fatty residues in laundry, dishwashers and for cleaning of clogged drains. Another important factor is that the usage of lipase in detergent formulations allows laundering at lower temperatures and thus reduces the energy expenditure (Rathi et al., 2001; Gerritse et al., 1998). An ideal detergent enzyme should be stable at high pH values and temperature, withstand oxidizing and chelating agents, effective at low enzyme levels and have broad substrate specificity (Hemachander and Puvanakrishnan, 2000).

Enhancing lipase production during the cultivation process is also an important step in industrial application of this enzyme. Different environmental factors have been extensively studied to increase lipase productivity, such as carbon sources, pH and temperature, among others (Silva et al., 2005; Costas et al., 2004). Many microbial lipases are only produced in the presence of an inducer. This may be a triglyceride, a fatty acid or another lipid. Lipids or fatty acids do not appear to be required for the production of lipase activity in a second group of microorganisms, but incorporation of these compounds increased the level of lipase activity produced (Silva et al., 2005; Rapp, 1995).

In this study the alkaline lipase production by *Fusarium oxysporum*, considering that lipase activity and production depend upon the composition and condition of the fermentation medium, was carried out. For optimization of this enzyme production, we examined the medium composition and used a two-level factorial design with two variables, medium pH and incubation temperature.

MATERIAL AND METHODS

Strains

The microorganisms were isolated from fruits and soil from the Brazilian Northeast (Maceió, AL, and Aracaju, SE). The fungus *Fusarium oxysporum* LB152B was selected from Jenipapo fruit (Aracaju, SE). The cultures were maintained at 4 °C on potato dextrose agar tubes.

Isolation and screening of lipase-producing microorganisms

The solid medium plate used for screening contained (w/v): olive oil 1.0%; peptone 0.3%; yeast extract 0.2%; K₂HPO₄ 0.2%; MgSO₄·7H₂O 0.1%; Na₂CO₃ 0.1%; agar 2.0%; and Rhodamine B 0.001% (Lin et al.,1995). The microorganisms were incubated at 30 °C for 24 to 96 h. The colonies having a clearance zone due to oil hydrolysis were selected and maintained at 4 °C on potato dextrose agar tubes.

Screening of lipase-producing microorganisms

The selected microorganisms were cultivated for 96 h, at 30 °C in a basal medium consisting of (w/v): glucose 1.0%; peptone 0.3%; yeast extract 0.2%; K₂HPO₄ 0.2%; MgSO₄·7H₂O 0.1%; Na₂CO₃ 0.1%; and agar 2.0%. After that, they were transferred to a screening medium containing (w/v): olive oil 1.0%; peptone 1.5%; yeast extract 0.5%; K₂HPO₄ 0.3%; MgSO₄·7H₂O 0.04%; Na₂CO₃ 1%; and Triton X-100 0.2% in a 100-mL flask. Fermentation was carried out at 30 °C under 160 rpm shaking. After 24 h, 1 mL of the culture medium was transferred to a fresh medium, incubated for more 48 h. The cultures were chilled rapidly to 4 °C and the cells were removed by filtration using Whatman filter (Grade 42 – Ashless Quantitative Filter)(Lin et al. 1995, modified).

Effect of medium components in lipase production from *F. oxysporum*

For enzyme production, the strain was grown as described above on three different media: A (screening medium with Triton X-100 0.2% w/v); B (screening medium without Triton X-100); and C (corn steep liquor medium containing (w/v): corn steep liquor 1.0%; soybean meal 2.0%; K₂HPO₄ 0.5%; Na₂CO₃ 0.2%).

Factorial design

Two factorial designs were carried out. In the first one, a 2² experimental design with star configuration (4 axial points) and 3 central points, totaling 11 experiments, to study the effect of medium pH and incubation temperature, then the variables were pH and temperature (°C). The distance of axial points was ± 1.41 , calculated from equation 1 (Barro Neto, 2001). Additionally, a 2² factorial design, in replicate, was employed, in which the composition medium and olive oil concentration were studied.

$$\alpha = n^{1/2} \quad (1)$$

α is the distance of axial points; n is the number of independent variables.

All data were treated with the aid of STATISTICA 5.0 from Statsoft Inc. (2325 East 13th Street, Tulsa, OK, 74104, USA).

The independent variables and their levels are presented in Table 1 (first factorial design) and Table 3 (second factorial design).

Assay of Lipase

Lipase assay was performed with olive oil (Azeite “Gallo”, Victor Guedes, Ind. e Com., S.A., Portugal) emulsion; which was prepared by mixing 25 mL of olive oil and 75 mL of 7% gum arabic solution in a homogenizer for 2 min. The reaction

mixture containing 5 mL of olive oil emulsion, 4 mL of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0, 1 mL of 110 mM CaCl₂ and 1 mL of the culture filtrate at 37 °C for 20 min with orbital shaking at 160 rpm. The reaction was immediately disrupted after incubation by the addition of 15 mL acetone:ethanol mixture (1:1 v/v), and the liberated free fatty acids were titrated with 50 mM NaOH. One unit (U) of lipase activity was defined as the amount which liberated 1 µmol of fatty acid per min (Macedo et al., 1997).

RESULTS AND DISCUSSION

Screening of lipase-producing microorganisms

The lipase production by 216 strains (bacterial, fungi and yeasts) isolated from fruit and soil samples were examined. Forty-two percent of all microorganisms did not grow in Rhodamine medium, probably because of the alkaline pH around 10.0. Of the remainder strains tested for lipase activities in Rhodamine medium, 72 microorganisms showed clearance zone around the colonies after 48 to 96 h of incubation at 30 °C. The size of the clearance zone was variable (Figure 1).

Seventy-two microorganisms were grown in screening liquid medium to obtain the best strain capable to produce extracellular alkaline lipase. The maximum amounts of lipolytic activities were produced by strain 152B (7.12 U.mL⁻¹). Accordingly, this strain was identified as *Fusarium oxysporum* and used to study the effect of growth conditions on the production of extracellular alkaline lipase.

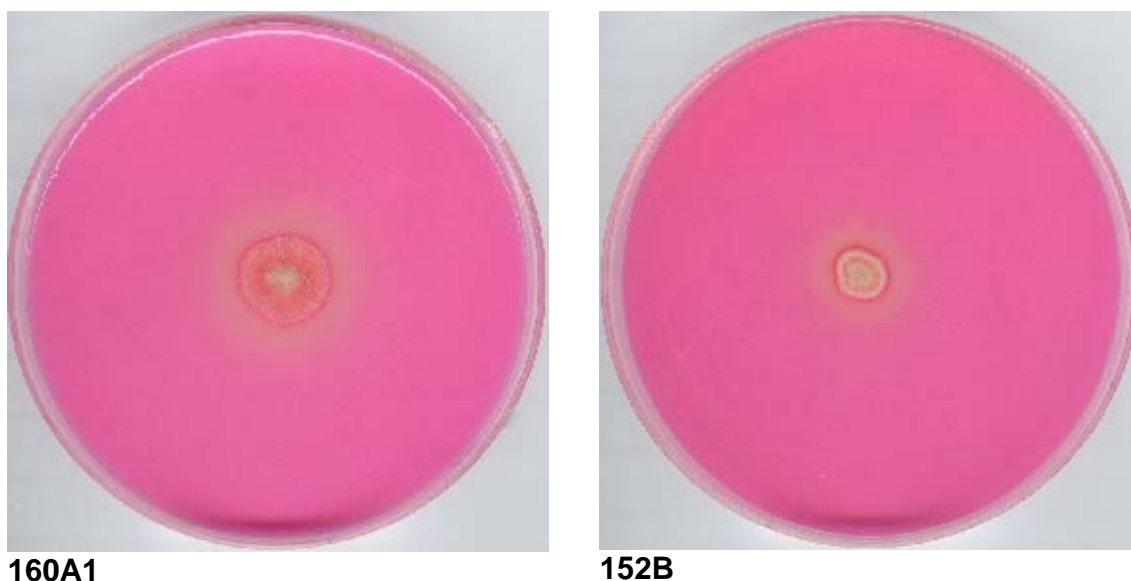


Figure 1: Solid medium plate containing Rhodamine B and olive oil was used for screening of the strains producing extracellular alkaline lipase. The strains 160A1 and 152B produced a clearance zone after 72h incubation at 30 °C.

Effect of medium components in lipase-production from *F. oxysporum*

The activity of extracellular lipase of *Fusarium oxysporum* culture was evaluated after 72 h of incubation in three different media: A (screening medium with Triton X-100 0.2% w/v); B (screening medium without Triton X-100); and C (corn steep liquor medium). Highest lipase activity of 10.16 U.mL⁻¹ was observed in medium B, an increase of 1.31 and 2.34 fold lipase productions comparing to medium A and C, respectively (Figure 2).

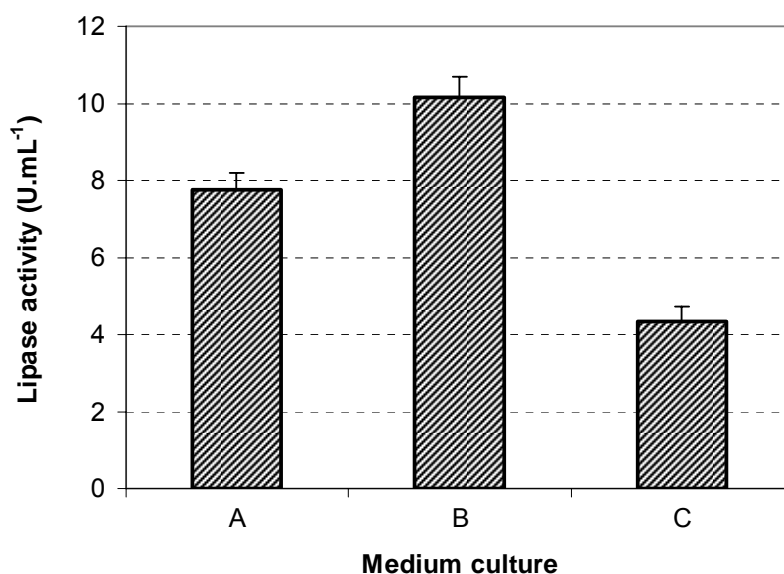


Figure 2: Effect of medium components in extracellular alkaline lipase production. The lipase activity was determined as described in methods for each medium. The experiments were performed in triplicate and bars represent the standard derivation. **A** (screening medium with Triton X-100); **B** (screening medium without Triton X-100); and **C** (corn steep liquor medium)

These results (Figure 2) indicated that *Fusarium oxysporum* produced maximal alkaline lipase in a medium that contained peptone (0.3%) and yeast extract (0.2%) as nitrogen sources. This suggests that peptone is necessary for significant lipase formation by this fungus, as observed for lipase production by *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Rapp, 1995).

The addition of arabic gum (7%) to the screening medium did not increase the lipase production (date not showed), differing from *Acinetobacter calcoaceticus*, when the total lipase production was 2 to 5-fold higher in media containing arabic gum than in media without this polysaccharide (Mahler et al., 2000).

On the other hand, Triton X-100 inhibited the lipase production (Figure 2). This result differs from Lin et al. (1995). They observed that Triton X-100 is a significant factor that increases lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111.

A model fitting was accomplished for the first experimental design as shown in Table 1. The independent and dependent variables were inserted in to the second-order model equation and examined in terms of the goodness of fit. The ANOVA test was used to evaluate the adequacy of the fitted model. The *R*-squared value provided an index between the variability in the observed response values and those experimental factors and their interactions. A good model (values above 0.9 are considered very well) explains most of the variation in the response.

Table 1: Coded levels and real values (in parentheses) for the 2^2 factorial design with star configuration (4 axial points) and 3 central points (11 trials) and lipase activity (U.mL^{-1}) at 72h of fermentation on medium B.

Run	Variables		Lipase Activity (U.mL^{-1})
	pH	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	
1	-1 (3.8)	-1 (25)	13.25
2	+1 (8.1)	-1 (25)	28.75
3	-1 (3.8)	+1 (35)	2.50
4	+1 (8.1)	+1 (35)	0.17
5	0 (6.0)	0 (30)	34.50
6	0 (6.0)	0 (30)	32.33
7	0 (6.0)	0 (30)	33.00
8	-1.41 (3.0)	0 (30)	4.08
9	0 (6.0)	+1.41 (37)	0.25
10	+1.41 (9.0)	0 (30)	3.50
11	0 (6.0)	-1.41 (23)	24.00

On the basis of the analysis of variance (ANOVA), as showed in Table 2, a second order model (Equation 2) was established, describing the enzyme activity as a function of pH and incubation temperature. Based on F test, the model is predictive, since its calculated F value is higher than the critical F value and the regression coefficient is (0.97553) is close to unity. The coded model was used to generate response surface for the analysis to the variable effects on lipase activity (Figure 3). As it can be seen in Figure 3, the maximum lipase activity predicted to pH 6.0 and 30 °C was approximately 33 U.mL⁻¹.

$$\text{Activity} = 33.28 + 1.54X_1 - 9.11X_2 - 13.94X_1^2 - 9.77X_2^2 - 4.46X_1X_2 \quad (2)$$

(±0.64) (±0.39) (±0.39) (±0.47) (±0.47) (±0.56)

X_1 is pH and X_2 is temperature

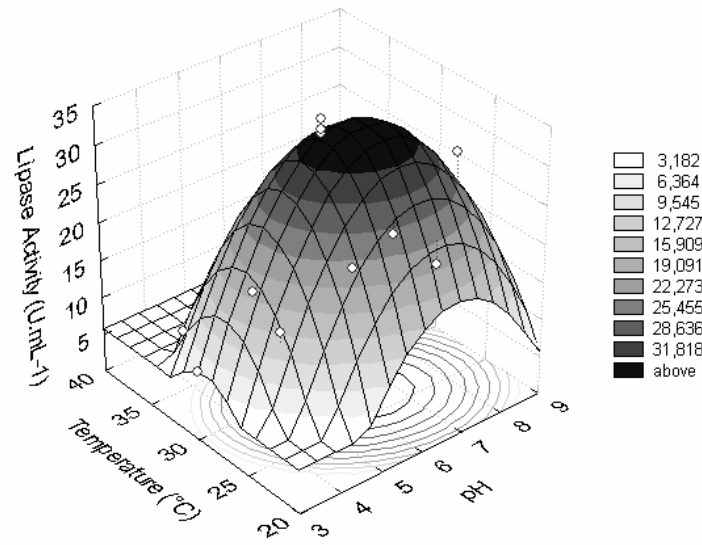
Table 2: ANOVA for the second factorial design describing the enzyme activity as a function of pH and temperature of fermentation.

Source of variation	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F-ratio (model significance)
Regression	2059.61	5	411.9	39.86 ^a
Residual	51.67	5	10.3	
Lack of fit	49.20	3	16.4	13.3 ^b
Pure error	2.47	2	1.2	
Total	2111.27	10	-	

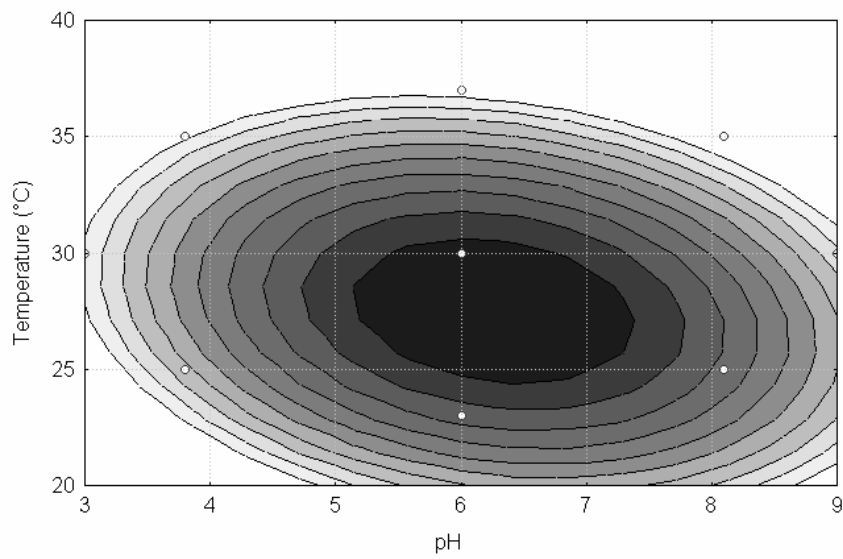
Regression coefficient: $R = 0.97553$

^a F -ratio (regression/residual); $F_{0.95,4,12}=5.05$

^b F -ratio (lack of fit/pure error); $F_{0.95,10,2}=19.16$



(a)



(b)

Figure 3: Response surface (a) and contour diagrams (b) to effects of medium pH and temperature in extracellular alkaline lipase production. The lipase activity was determined as described in methods for each medium.

The experimental conditions and the results for lipase activity as a function composition medium and concentration of olive oil, in the second factorial design, are shown in Table 3. An estimate of the main effect is obtained by evaluating the difference in process performance caused by a change from the low (-1) to the high (+1) level of the corresponding factor (Barro Neto, 2001). The process performance was measured by the lipase activity response. It can be seen that the most relevant variable concerning the lipase activity is olive oil (Table 4, Figure 3). An increase in olive oil concentration from 0% to 2% exhibited a positive influence, enhancing lipase activity, however, this effect is more important to B medium than to C. Nevertheless, the interactive effect B medium and olive oil showed the maximum lipase production at the conditions pH 6,0 and 30 °C.

Table 3: Coded levels and real values (in parentheses) for the 2² factorial design (8 trials) and lipase activity (U.mL⁻¹) at 72h of fermentation, pH 6.0 at 30 °C.

Run	Variables		Lipase Activity (U.mL ⁻¹)
	Medium	Olive oil (%)	
1	-1 (B)	-1 (2)	30.87
2	-1 (B)	-1 (2)	33.37
3	+1 (C)	-1 (2)	15.25
4	+1 (C)	-1 (2)	15.87
5	-1 (B)	+1 (0)	1.37
6	-1 (B)	+1 (0)	1.50
7	+1 (C)	+1 (0)	9.75
8	+1 (C)	+1 (0)	10.87

B (screening medium without Triton X-100)

C (corn steep liquor medium)

Table 4: Main effect analysis for lipase activity from the first factorial design at 72 h of fermentation, pH 6.0 at 30 °C.

Factor	Effect	Std. Err.
Culture medium (1)	-3.96	± 0.81
% Olive oil (2)	+18.09	± 0.81
(1) x (2)	-12.84	± 0.81

Rapp (1995) also observed the production of extracellular lipase activity in growing cultures of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* was further enhanced by addition of olive oil, trimyristin, Span 85 and oleic acid. This result suggests that long-fatty acid or its derivative or its metabolic product is the inducer of lipase synthesis in *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. Although these materials have been reported to induce lipase secretion by some microorganisms, their effect is variable, and therefore, difficult to generalize (Costas et al., 2004). Alkaline lipase production by *Acinetobacter radioresistens* was investigated and a high lipase yield could be obtained during prolonged cultivation in the presence of n-hexadecane. With additional olive oil supplementation, the volumetric productivity of lipase could be improved; however, the lipase yield decreased with increasing concentrations of olive oil (Chen et al., 1998). On the other hand, oleic acid acted as a repressor to lipase production by *Acinetobacter calcoaceticus* (Mahler et al., 2000).

In conclusion, lipase production depends upon the composition, pH medium and temperature condition of the fermentation. The maximum enzyme production by *Fusarium oxysporum* was using olive oil 2% as carbon source and peptone 0.3% and yeast extract 0.2% as nitrogen sources. The optimization of the fermentation condition, using model fitting, yielded 33 U.mL⁻¹, at pH 6.0 and 30 °C, which represents a fivefold increase in the lipase production.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, Redes Cooperativas de Pesquisa/Financiadora de Estudos e Projetos (Recope/FINEP), Brazil, and CNPq scholarship to J.N.P and P.D.M.

We thank Prof. Dr. Angélica Zaninelli Schreiber, Faculty of Medical Sciences, Unicamp, Brazil, for technical assistance in the identification of the microorganism *Fusarium oxysporum*, and Prof. Dr. Berger for providing genetic methods to confirm fungi identification by DNA sequence. Thanks are also to Mr. Frampton Santana for his technical assistance in statistical analysis.

REFERENCES

- Barro Neto, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E., 2001. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. *Editora da Unicamp*, Campinas, SP, Brazil, (in Portuguese).
- Castro-Ochoa, L.D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., Ros, R.O., 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 648-654.
- Chen, S.-J., Cheng, C.-Y., Chen, T.-L., 1998. Production of an Alkaline Lipase by *Acinetobacter radioresistens*. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 308-312.
- Costas, M., Deive, F.J., Longo, M.A., 2004. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. *Process Biochem.* 39, 2109-2114.
- Gerritse, G., Hommes, R.W.J., Quax, W.J., 1998. Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2644-2651.

- Gulati, R., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, W.S., 1999. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. *Process Biochem.* 35, 459-464.
- Hemachander, C., Puvanakrishnan, R., 2000. Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations. *Process Biochem.* 35, 809-814.
- Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O., 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 29-63.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S., Gupta, R. 2005. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expr. Purif.* 41, 38-44.
- Lin, S.-F., Chiou, C.-M., Tsai, Y.-C., 1995. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnol. Lett.* 17, 956-962.
- Macedo, G.A., Park, Y.K., Pastore, G.M., 1997. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Braz. J. Microbiol.* 28, 90-95.
- Macedo, G.A., Lozano, M.M.S., Pastore, G.M., 2003. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from *Rhizopus* sp. *Process Biotechnol.* 6 (1) (*Short Communication*).
- Mahler, G.F., Kok, R.G., Cordenons, A., Hellingwerf, K.J., Nudel, B.C., 2000. Effects of carbon sources on extracellular lipase production and *lip A* transcription in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24, 25-30.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29, 119-131.

- Rapp P., 1995. Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 832-838.
- Rathi, P., Saxena, R.K., Gupta, R., 2001. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry* 37, 187-192.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19, 627-662.
- Silva, W.O.B, Mitidieri, S., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2005. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry* 40, 321-326.

CAPÍTULO 3: Caracterização da lipase alcalina de *Fusarium oxysporum* para formulação de detergente

RESUMO

Atualmente, há uma tendência de utilizar baixas temperaturas em limpeza de lavanderia por razões ambientais e econômicas, situações estas que tornam indispensáveis o uso de enzimas em produtos detergentes. Devido às lipases serem excelentes catalisadoras em soluções e na interface água-óleo, elas são potencialmente apropriadas para aplicação na remoção de manchas de gorduras em lavanderia industrial e detergentes domésticos. A atividade enzimática da lipase de *Fusarium oxysporum* foi avaliada em diferentes detergentes comerciais e surfactantes, através de ensaios com *p*-nitrofenilpalmitato (*p*NPP). A enzima foi compatível com vários surfactantes iônicos e não-iônicos como também com detergentes comerciais. Atividade lipolítica foi fortemente inibida por SDS, mas não por Triton X-100 e Triton X-114. A enzima mostrou-se estável em pH alcalino e manteve 93% da atividade após 1 h de incubação a 60°C. A maior atividade lipolítica foi verificada com triglicerídeos de ácidos graxos de cadeia média e longa (C₈-C₁₈). Esta enzima mostrou uma variável especificidade hidrolítica sobre vários óleos e gorduras testados. Todas estas propriedades e sua resistência a vários surfactantes e detergentes comerciais fazem desta lipase um aditivo potencial para formulação de detergentes.

Palavras-chaves: Lipase alcalina, *Fusarium oxysporum*, caracterização, detergentes.

Trabalho submetido a Revista Brazilian Journal of Microbiology em Março de 2006.

Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* for detergent formulation

ABSTRACT

Nowadays, there is a tendency of laundry cleaning at low temperature for both environmental and economical reasons which makes the use of enzymes in detergent products indispensable. Since lipases are efficient catalyst both in solution and at the water-liquid interface, they are potentially suitable for lipid stain removal applications in industrial laundry and household detergents. Enzymatic activities of lipase from *Fusarium oxysporum* were determined by using *p*-nitrophenylpalmitate (*p*NPP) as substrate at different commercial detergents and surfactants. The enzyme was compatible with various ionic and non-ionic surfactants as well as commercial detergents. Lipase activity was strongly inhibited by SDS, but not by Triton X-100 and Triton X-114. The enzyme was stable at alkaline pH and remained 93% of activity after 1 h incubation at 60°C. The highest lipase activity was verified with triglycerides of middle and long chain fatty acids (C₈-C₁₈). This enzyme showed a variable specificity/hydrolytic activity towards various fats and oils. All these properties and its resistance towards various surfactants and detergents turn this lipase in a potential additive for detergent formulation.

Keywords: Alkaline lipase, *Fusarium oxysporum*, characterization, detergents.

INTRODUCTION

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) hydrolyze tri-, di- and monoglycerides at an oil-water interface where the lipases activities are greatly increased by a mechanism of interfacial activation (Kulkarni and Grade, 2002; Helistö and Korpela, 1998). The majority of lipases exhibit a high activity toward lipids with fatty acid residues of C₈ to C₁₈ chain length (Rapp, 1995). The lipase used in each application is selected based on its substrate specificity such as fatty acid, alcohol, position (regio-) and stereospecificity, as well as temperature and pH stability (Saxena et al., 2003).

Microbial lipases have already established their vast potential regarding to their usage in different industries. The interest in microbial lipase production has increased in the last decades, because of its large potential in industrial applications as additives in foods (flavor modification), fine chemicals (synthesis of esters), waste water treatment (decomposition and removal of oil substances), cosmetics (removal of lipids), pharmaceuticals (digestion of oil and fats in foods), leather (removal of lipids from animal skins) and medical (blood triglyceride assay) (Burkert et al., 2004; Davranov, 1994; Pandey et al., 1999; Kumar et al., 2005). However, the single biggest market of their use is in the detergent formulation (Rathi et al., 2001, Jaeger, 1998). New challenges for detergent producers can be pointed out (Sharma et al., 2002; Sharma et al., 2001; Jaeger and Reetz, 1998): (1) the high variation in the triglyceride content of fat stains, requiring lipases with low substrate specificity; (2) the relatively harsh washing conditions (pH10-11 and 30-60°C), requiring stable enzymes; and (3) the effects of chemical denaturation and/or proteolytic degradation caused by detergents additives such as surfactant linear alkyl benzene sulfonate (LAS) and proteases. The functional importance of lipases in the detergent industry is related to removing fatty residues in laundry, dishwashers as well as for cleaning of clogged drains.

The purposes of the present study were to characterize the alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* with respect to optimal pH and temperature as well as stability, and evaluate effects of several detergents and surfactants.

MATERIAL AND METHODS

Strain

Fusarium oxysporum was isolated from Brazilian Northeast fruits (Maceió, AL, and Aracaju, SE).

Chemicals

Olive oil used for lipase assay was from Azeite “Gallo”, Victor Guedes, Ind. e Com., S.A., (Portugal). All analytical chemicals and media components used were highest purity grade available commercially. All other oils and commercial detergents used were purchased locally.

Lipase production

Fusarium oxysporum was cultivated for 96 h, at 30 °C in tubes with medium consisting of (w/v): glucose 1.0%; peptone 0.3%; yeast extract 0.2%; K₂HPO₄ 0.2%; MgSO₄·7H₂O 0.1%; Na₂CO₃ 0.1%; and agar 2.0%. After that, 10 mL of sterilized water were added into the tube, the surface of the culture was scraped, and 1 mL of this liquid was transferred to a liquid medium containing (w/v): olive oil 1.0%; peptone 1.5%; yeast extract 0.5%; KH₂PO₄ 0.3%; MgSO₄·7H₂O 0.04%, pH 6.0. Fermentation was carried out at 30 °C under 160 rpm shaking. After 24 h, 1 mL of the culture medium was transferred to a fresh medium, and incubated for more 48 h. The supernatant was chilled rapidly to 4 °C and the cells were removed by filtration. This supernatant was fractionated with ammonium sulfate to 70% saturation. After centrifugation, the precipitated was dialyzed against water at 4°C and freeze-dried (Lin et al., 1995, modified).

Assay of Lipase

All the experiments were performed in triplicate and the standard derivation calculated.

Assay using olive oil as substrate: Lipase activity was determined by titrimetry using olive oil emulsion which was prepared by mixing 25 mL of olive oil and 75 mL of 7% arabic gum solution in a homogenizer for 2 min. The reaction mixture containing 5 mL of olive oil emulsion, 4 mL of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 1 mL of 110 mM CaCl_2 and 1 mL of enzyme (5 mg/mL) was incubated at 50 °C for 30 min with orbital shaking at 160 rpm. The reaction was immediately stopped after incubation by the addition of 15 mL acetone:ethanol mixture (1:1 v/v), and the released free fatty acids were titrated with 50 mM NaOH. One unit (U) of lipase activity was defined as the amount that released 1 μmol of fatty acid per min (Macedo et al., 1997).

Assay using different fats and oils as substrates: 2% (w/v) of fats and oils (olive oil, soybean oil, sunflower oil, corn oil, chicken oil and milk cream) and 100 mM of triglycerides (triacetin, tributyrin, tricaprylin, trilaurin and triolein) were individually add on the reaction mixture containing 4 mL of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 1 mL of 110 mM CaCl_2 and 1 mL of enzyme (5 mg/mL). After 30 min of incubation at 50 °C with orbital shaking at 160 rpm, the reaction was immediately stopped by the addition of 15 mL acetone:ethanol mixture (1:1 v/v), and the released free fatty acids were titrated with 50 mM NaOH. One unit (U) of lipase activity was defined as the amount that released 1 μmol of fatty acid per min.

Assay using *p*-nitrophenylpalmitate (pNPP) as substrate: The activity was assayed with reaction mixture, in a final volume of 1 mL, containing 40 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 20 mM pNPP, as substrate, and 25 μL of enzyme (5 mg/mL). After 10 min of incubation at 40°C, the reaction was stopped by the addition of 2 mL of ethanol 96%, and the *p*-nitrophenol released was monitored spectrophotometrically at 420 nm, using a standard curve. One lipase unit (U) was defined as the amount of enzyme that released 1 μmol *p*-nitrophenol per minute.

Effect of pH

The pH effect on activity was studied by olive oil assay in a pH range of 3.5-11.0 using different buffers at 50 mM concentration, during 30 min, at 50°C to determine optimum pH. Stability was determined by incubating one milliliter enzyme (5 mg/mL) in buffer of different pH values during 24h at 4°C, and the activity assay at 50°C, pH 8.0. Afterwards, the assay was performed as described for olive oil assay.

The buffers used were: pH values of 3.6, 4.6 and 5.6 (Acetate); pH values of 6.0, 7.0 and 8.0 (Phosphate); pH 9.0 (Tris-HCl); pH values of 9.5, 10.0 and 10.5 (Carbonate-Bicarbonate).

Effect of temperature

Temperature effect on lipase activity was studied by carrying out the enzyme reaction at different temperatures in the range of 10-70°C at pH 8.0 using Tris-HCl buffer (50 mM). The thermostability of lipase was tested by pre-incubating at varying temperatures ranging from 30 to 80°C for 1 h, pH 8.0. After that, the assay was performed as described for olive oil assay.

Effect of surfactants and commercial detergents

The enzyme sample was incubated in presence of surfactants (Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X-100, Triton X-114, SDS and surfactin from *Bacillus subtilis* (Nitschke and Pastore, 2005) and commercial detergents (Omo, Vida Plus, Tixan, Ace, Ariel, Brilhante, Surf and Revel) for 1h at room temperature ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) and residual activity determined at pH 8.0 and 50°C for 10 min, using *p*-nitrophenylpalmitate.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present work alkaline lipase was more active in pH range between 7.0 and 9.5, and it showed higher activity at pH 8.0. This enzyme was found to be stable in pH 7.0 to 9.0, and it kept around 45% activity after 24h incubation in buffer of pH 11.0, at 4°C (Fig. 1). The optimum reaction temperature was 50°C. Thermal stability was investigated by incubating the enzyme at various temperatures for 1h. The enzyme showed great stability up to 60°C (Fig. 2).

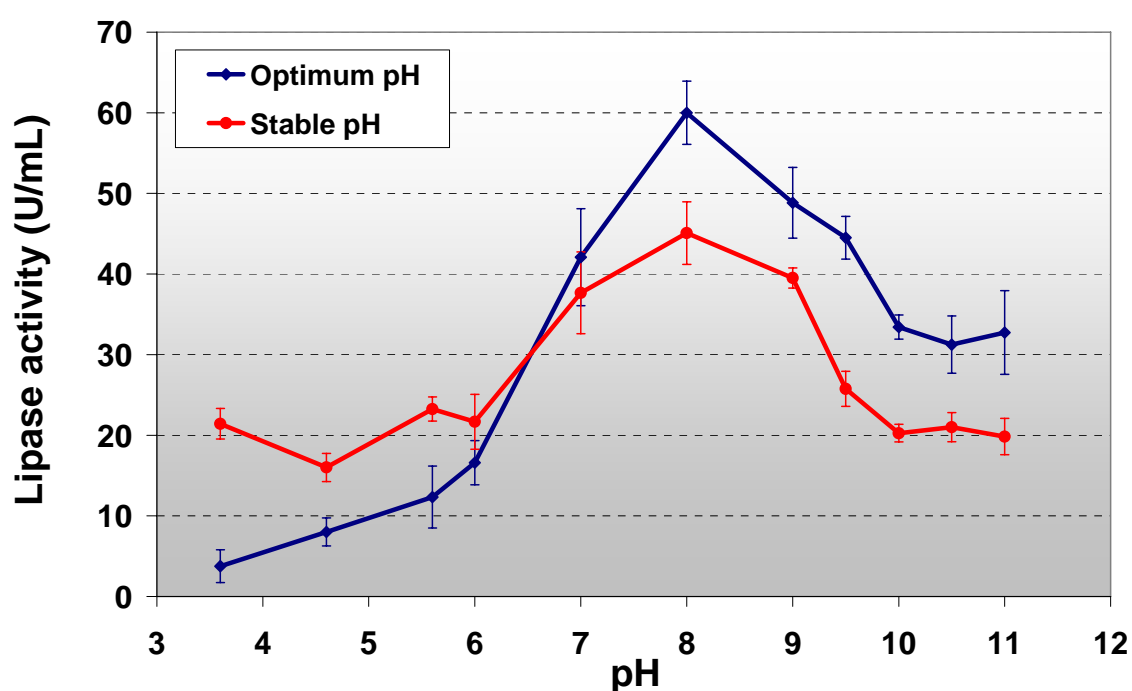


Figure 1: Effects of pH on alkaline lipase activity and stability. The experiments were performed in triplicate and bars represent the standard derivation.

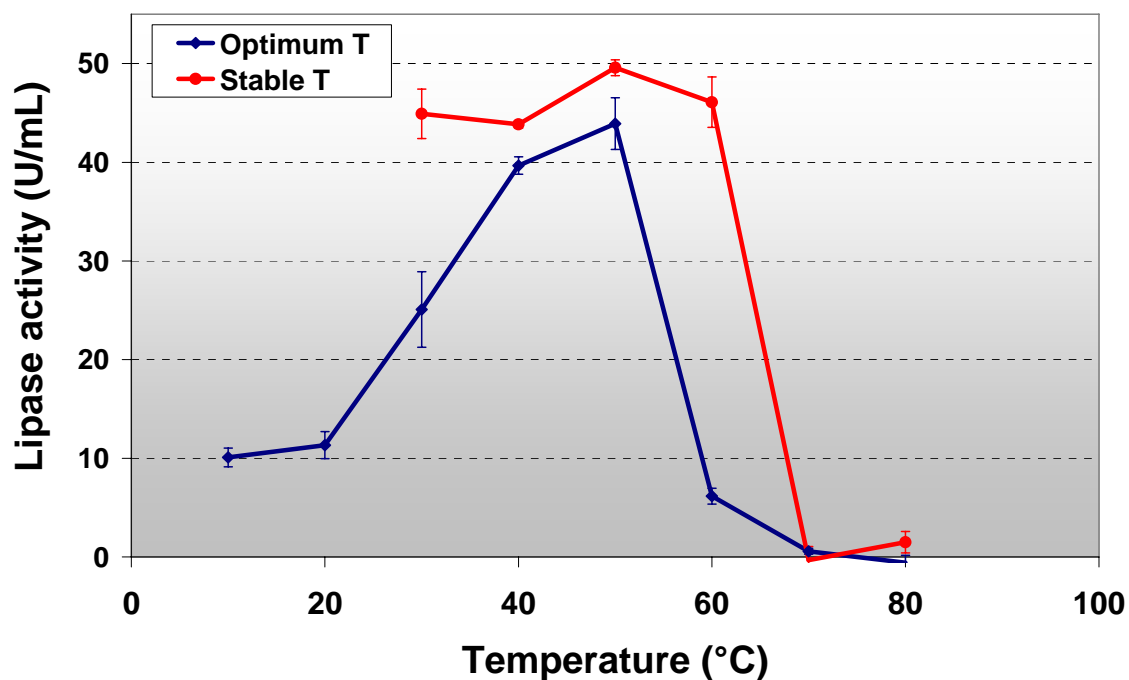


Figure 2: Effects of temperature on alkaline lipase activity and stability. The experiments were performed in triplicate and bars represent the standard derivation.

Fig. 3 shows lipolytic hydrolysis toward various triglycerides. Triglycerides of middle (C8-12) and long (C₁₈) chain fatty acids were favored of lipolytic activity. These results were similar as presented by lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* (Hoshino et al., 1992). On the other hand, Rapp (1995) described different properties to lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, which presented higher activity toward trilaurin at pH 5.0 and 45°C, and it was not very thermostable.

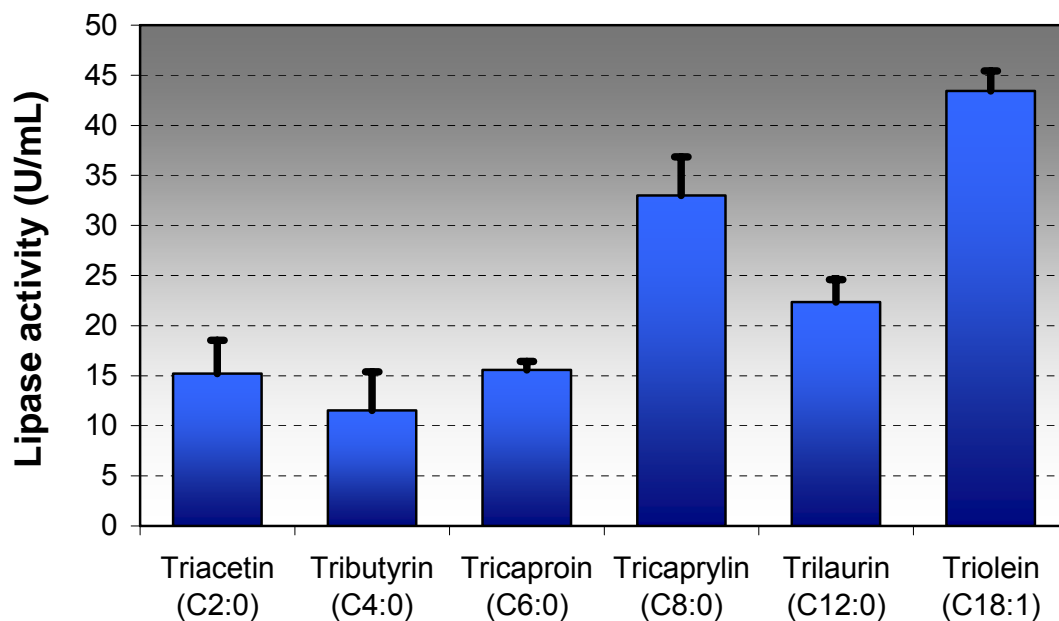


Figure 3: Substrate specificities of alkaline lipase toward several triglycerides. The experiments were performed in triplicate and bars represent the standard derivation.

The enzyme was found to be active on a wide range of natural substrate of either vegetable or animal origin. This enzyme hydrolyzed various natural lipids at different rates. This lipase showed major activity on vegetable oil and higher activity on corn oil 125% comparing to olive oil. Lipolytic activity on milk cream was 30 % lower than olive oil (Fig.4).

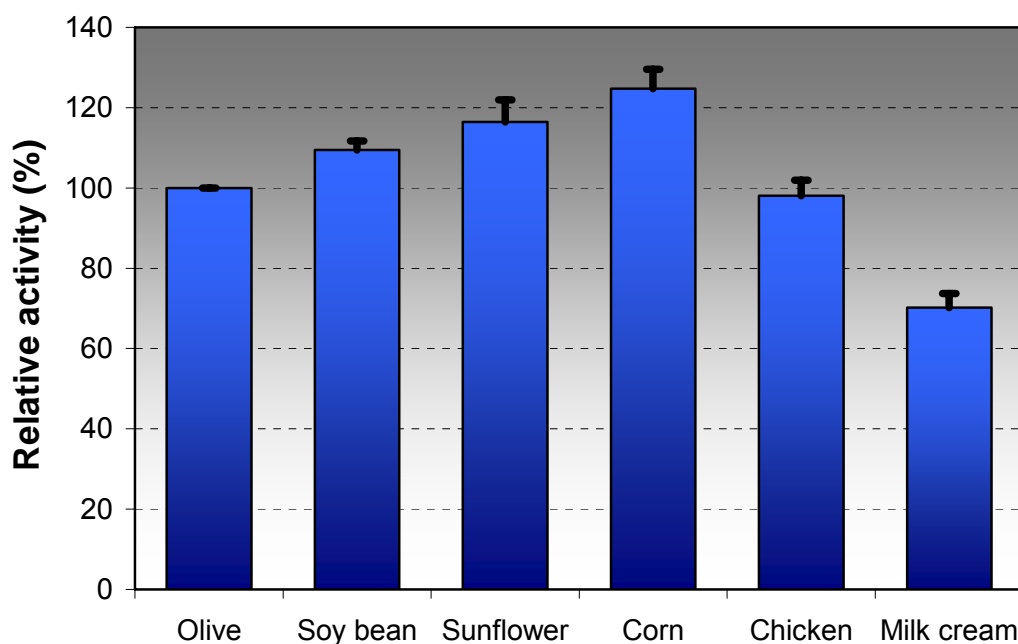


Figure 4: Level of hydrolysis activity from different fatty and oil compare to olive oil (olive oil was taken as 100%). The experiments were performed in triplicate and bars represent the standard derivation.

The effects of various surfactants and commercial detergents on the alkaline lipase activity were tested at 10% and 0.1% (w/v). Table 1 shows that this enzyme is stable in both ionic and non-ionic surfactants. Tween 40, Tween 80 and surfactin inhibited up to 30% lipase activity after 2h incubation at 30°C. On the other hand, Triton showed an activator effect. The effects of commercial detergents showed different rates of lipase inhibition on same conditions as the surfactants, probably due to the detergents composition. Rath et al. (2001) described similar surfactant effects, however *Burkholderia cepacia* lipase was more stable toward commercial detergents as *Fusarium oxysporum* lipase. SDS was a strong inhibitor in *Aspergillus caneus* (Saxena et al., 2003) and *Bacillus thermoleovorans* CCR11 (Castro-Ochoa et al., 2005) lipases, causing almost total inhibition of enzyme activity. Pocalyko and Tallman (1998) have studied the adverse effect of SDS on the activity and stability

of cutinase. They suggested that SDS causes local conformation changes in the active site that result in inhibition, partial reversible unfolding, and subsequent inactivation.

Table 1: Lipase stability in presence of surfactants and detergents.

Surfactants/ detergents	(% w/v)	Relative activity (%)
Control^a		100.00
<i>Surfactants</i>		
Tween 20	10	98.75
Tween 40	10	82.57
Tween 80	10	69.93
Triton X-100	10	110.72
Triton X-114	10	147.39
SDS	0.1	2.39
Surfactin	1	86.86
<i>Commercial detergents</i>		
Omo	0.1	20.19
Vida Plus	0.1	48.91
Tixan	0.1	21.55
Ace	0.1	52.55
Ariel	0.1	34.93
Brilhante	0.1	22.65
Surf	0.1	31.94
Revel	0.1	30.55

All of experiments were done in triplicate and repeated twice.

^a No addition of surfactants and detergents; Activity = 732 U/mL at 40 °C and pH 8.0

CONCLUSION

The lipase from *F. oxysporum* has several properties of significant industrial importance, in particular, pH and temperature stability, C₈-C₁₈ wide specificity. Due to all features presented by this lipase, activity in alkaline pH, high temperature, resistance to many surfactants, and tolerance to commercial detergents make this enzyme a potential for detergent application. Further work to establish what kind of commercial detergent this lipase can be applied and better application conditions are necessary to be carried out.

ACKNOWLEDGEMENTS

The financial assistance provided by CNPq and Recope/Finep.

REFERENCES

1. Burkert, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresour. Technol.*, 91:77-84, 2004.
2. Castro-Ochoa, L.D.; Rodríguez-Gómez, c.; Valerio-Alfaro, G.; Ros, R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme Microb. Tech.*, 37:648-654, 2005.
3. Davranov, K. Microbial lipases in biotechnology (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.*, 30(4-5):427-432, 1994.
4. Helistö, P. and Korpela, T. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme Microb. Tech.*, 23:113-117, 1998.

5. Hoshino, T.; Sasaki, T.; Watanabe, Y.; Nagasawa, T.; Yamane, T. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(4):660-64, 1992.
6. Jaeger, K.-E. and Reetz, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIBTECH*, 16:396-403, 1998.
7. Kulkarni, N. and Gadre, R.V. Production and properties of alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28:344-348. 2002.
8. Kumar, S.; Kikon, K.; Upadhyay, A.; Kanwar, S.S.; Gupta, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expr. Purif.*, 41:38-44, 2005.
9. Lin, S-F.; Chiou, C-M.; Tsai, Y-C. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Biotechnol. Lett.*, 17(9):956-962, 1995.
10. Macedo, G.A.; Park, Y.K.; Pastore, G.M, Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Braz. J. Microbiol.*, 39:687-692, 1997.
11. Nitschke, M. and Pastore, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Biotechnol. Research*, 97:336–341, 2006.
12. Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Kriger, N.; Soccol. V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Bioc.*, 29:119-131, 1999.
13. Pocalyko, D.J. and Tallman, M. Effect of amphipaths on the activity and stability of *Fusarium solani* pisi cutinase. *Enzyme Microb. Tech.*, 22:647-651, 1998.

14. Rapp, P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Enzyme Microb. Tech.*, 17:832-838, 1995.
15. Rathi, P.; Saxena, R.K.; Gupta, R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochem.*, 37:187-192, 2001.
16. Saxena, R.K.; Davidson, W.S.; Sheoran, A.; Giri, B. Purification and characterization of alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochem.*, 39:239-247, 2003.
17. Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*, 19:627-662, 2001.
18. Sharma, R.; Soni, S.K.; Vohra, R.M.; Gupta, L.K.; Gupta, J.K. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochem.*, 37:1075-1084, 2002.

CAPÍTULO 4: Purificação e algumas características da lipase alcalina extracelular de *Fusarium oxysporum*

RESUMO

A lipase alcalina extracelular de *Fusarium oxysporum* foi purificada 20 vezes através de cromatografia em colunas de DEAE-Sepharose e Sephacyl-200. A preparação de lipase purificada apresentou três isoenzimas em gel IEF-PAGE, com pontos isoelétricos 7,15, 6,84 e 4,55. As massas moleculares das lipases *Lip 1* e *Lip 2* foram determinadas em gel SDS-PAGE, 30 e 29 kDa, respectivamente. Comparando-se as seqüências de aminoácidos, confirmou-se que as lipases *Lip 1* e *Lip 2* são isoenzimas que apresentam alta similaridade com a lipase de *F. heterosporum*. A lipase purificada apresentou atividade ótima em pH 8,0 e 40°C, utilizando o substrato *p*-nitrofenilpalmitato. A lipase purificada mostrou-se termoestável, perdendo cerca de 50% de atividade durante 1h de incubação a 40°C em pH 8,0.

Palavras-chaves: lipase, purificação, caracterização.

ABSTRACT

Purification and characterization of extracellular alkaline lipase from *Fusarium oxysporum*

The extracellular alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* was purified 20-fold, using DEAE-Sepharose and Sephacyl-200 chromatography. The purified lipase presented three isoenzymes in IEF-PAGE, with the following isoelectric points 7.15, 6.84 and 4.55. The molecular mass were determined to *Lip* 1 and *Lip* 2 in SDS-PAGE as 30 and 29 kDa, respectively. Comparing the amino acids sequences, *Lip* 1 and *Lip* 2 were confirmed to be isoenzymes and high similarity with the lipase from *F. heterosporum*. The purified lipase showed optimum activity in pH 8.0 and 40°C, using *p*-nitrophenylpalmitate as substrate. The purified lipase showed to be thermostable, losing around 50% of activity under 1h incubation at 40°C in pH 8.0.

Keywords: lipase, purification, characterization.

INTRODUÇÃO

As lipases (E.C.3.1.1.3) são esterases capazes de hidrolisar ésteres insolúveis em água, como triacilgliceróis de cadeias longas. Essas enzimas também catalisam reações de esterificação e transesterificação quando presentes em meio não aquoso. As lipases possuem uma característica particular de agir na interface entre as fases aquosa e não-aquosa (isto é, orgânica), o que as difere das esterases [13, 15]. Estas reações usualmente processadas com alta regio- e/ou enantio-seletividade, fazem das lipases um importante grupo de biocatalizadores na química orgânica [3]. Muitas lipases têm sido extensivamente purificadas e caracterizadas no que se refere a sua atividade e estabilidade com relação ao pH e temperatura, o efeito de metais e agentes quelantes. Em muitos casos, as lipases têm sido purificadas até sua homogeneidade e cristalização.

Os métodos de purificação usados têm geralmente dependido de técnicas não-específicas como precipitação, cromatografia de interação hidrofóbica, gel filtração e cromatografia de troca iônica. A cromatografia de afinidade tem sido usada em muitos casos para reduzir os numerosos passos de purificação individuais necessários [17].

Lipases de diferentes fontes têm sido isoladas e purificadas, principalmente de microrganismos como *Bacillus* sp. [1, 6, 18], *Pseudomonas pseudoalcaligenes* [8], *Aspergillus carneus* [19] *Geotrichum* sp. [4, 11], *Fusarium oxysporum* [2] e *Rhizopus* sp. [5]. Muitos dos esquemas de purificação de lipases são baseados em multipassos seqüenciais de métodos cromatográficos. Taipa, Aires-Barros & Cabral [20] compararam algumas estratégias de purificação comumente usadas para lipases e verificaram que:

- A precipitação é usada como um passo de separação de fácil aplicação e geralmente empregada nos primeiros estágios da purificação quando grandes volumes de extratos enzimáticos são tratados, e então seguida por separações cromatográficas;

- Dentre os métodos cromatográficos, o de troca iônica tem sido o mais utilizado para purificação de lipases. Os trocadores de íons fracos são os mais usados, sendo o dietilaminoetil (DEAE) o grupo mais empregado em trocas aniônicas e carboximetil (CM) em trocas catiônicas;

- Embora a gel filtração tenha baixa capacidade de separar grande quantidade de proteínas, é o segundo método mais empregado para purificação de lipases.

Os objetivos deste trabalho foram a purificação da lipase alcalina extracelular de *Fusarium oxysporum* e o estudo de algumas características da enzima purificada.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de lipase

O microrganismo *Fusarium oxysporum* foi cultivado por 96 h, a 30°C em um meio sólido contendo (% m/v água destilada): 1,0 glicose; 0,3 peptona; 0,2 extrato de levedura; 0,2 KH₂PO₄; 0,1 MgSO₄.7H₂O; 0,1 Na₂CO₃; 2,0 agar. Em seguida, foi adicionado 10 mL de água destilada estéril no tubo, e a superfície do meio raspada com alça de níquel. Deste conteúdo, 1 mL foi transferido para frasco Erlenmeyer de 100 mL contendo 20 mL de meio líquido (% m/v em água destilada): 1,0 óleo de oliva; 1,5 peptona; 0,5 extrato de levedura; 0,3 K₂HPO₄; 0,04 MgSO₄.7H₂O, pH 6,0. A fermentação ocorreu a 30°C, 160 rpm. Após 24 h, 1 mL do meio de cultivo foi transferido para um novo meio de cultura líquido, e incubado por mais 48 h. O meio de cultivo foi rapidamente resfriado a 4°C e as células removidas por filtração usando filtro Whatman (Grade 42 – Ashless Quantitative Filter) (modificado de Lin, Chiou & Tsai [7]).

Purificação da lipase de *F. oxysporum*

Fracionamento com sulfato de amônio

Uma amostra de dois litros de filtrado do meio de cultura foi saturada com 70% de sulfato de amônio. O sal foi adicionado lentamente sob agitação branda e a mistura permaneceu por 24 h a 4°C, para a total precipitação protéica. Esta mistura foi então centrifugada a 10.000 rpm por 20 min a 4°C e dialisada contra água bi-distilada a 4°C até total retirada do sal. Após diálise, a amostra foi filtrada em membrana de nitrato de celulose, poro de 0,45 µm (Merck). O filtrado foi utilizado como preparação enzimática bruta para a etapa de purificação em coluna de troca iônica.

Purificação da lipase em coluna de DEAE-Sepharose fast flow

Uma amostra de 2 mL de preparação bruta de lipase diluída em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,8, 0,35 M de NaCl, contendo 3 mg/mL foi aplicada em coluna DEAE-Sepharose fast flow de volume interno de 5 mL, equilibrada com o mesmo tampão. A aplicação da amostra ocorreu em fluxo de 0,5 mL/min de tampão, e estas frações coletadas em volumes de 1,25 mL. As proteínas adsorvidas foram eluídas pela aplicação de 220 mL de tampão de eluição, Tris-HCl 20 mM pH 7,8, sendo que deste total, 105 mL deste mesmo tampão contendo NaCl 0,5M e 115 mL contendo NaCl 1M, em fluxo de 2,0 mL/min.

As frações ativas (5,0 mL cada fração) foram coletadas em um único recipiente e concentradas através de filtro CENTRICOM® PLUS-80 (Millipore) de porosidade de 10.000 KDa, por centrifugação a 3.500 x g por 20 min. Para recuperar a amostra enzimática, o filtro foi invertido e centrifugado a 1.000 x g por 1 min. Esta amostra foi então utilizada no próximo passo de purificação.

Purificação da lipase em coluna de Sephacryl-200 fast flow

Uma amostra de 500 µL de lipase contendo 0,6 mg/mL de proteína foi aplicada em uma coluna *Sephacryl-200 fast flow* de 120mL de volume interno, 60 cm de

comprimento, equilibrada com tampão Tris-HCl pH 7,8, 20 mM contendo 200 mM de NaCl. As proteínas adsorvidas foram eluídas com o mesmo tampão e as frações ativas (1,98 mL cada fração) foram coletadas, dialisadas contra tampão Tris-HCl pH 7,8, 20 mM e utilizadas para os ensaios de caracterização da lipase.

Um equipamento de FPLC (Fast performance liquid chromatography - Pharmacia) foi utilizado nos passos de cromatografia em coluna DEAE-Sepahrose e Sephacryl-200.

Após cada passo de purificação foi determinada a atividade enzimática usando *p*-nitrofenilpalmitato como substrato, e a concentração de proteínas totais presentes nos extratos enzimáticos determinada de acordo com o método de Lowry [10], usando Albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições denaturantes (SDS-PAGE)

Os géis de corrida (12%, pH 8,8) e de empacotamento (4%, pH 6,8) foram preparados em tampão tris-HCL 0,3 M, em placa de 7 cm de comprimento. Os dois compartimentos da cuba foram preenchidos com tampão de corrida (0,2 M de glicina e 25 mM de Tris pH 8,3). Realizou-se uma pré-corrida de 1 h (60 mA). As amostras para a corrida foram preparadas tomando-se 20 µl e 20 µl de tampão da amostra (10% de glicerol, 0,08% do tampão Tris-HCl 1 M, pH 6,8, 2% de SDS, 5% de β-mercaptoetanol e 2 gotas do azul de bromofenol 0,2%). Então, as amostras (20 µl) foram aplicadas ao gel, por cerca de 2 h. Durante a corrida no gel de empacotamento manteve-se uma corrente de 60 mA, e no gel de corrida, 100 mA. O azul de bromofenol foi utilizado como marcador da corrida. Ao término da corrida, o gel foi retirado do tampão e levado para ser corado usando método da prata ou Coomassie Brilliant Blue.

Eletroforese de focalização isoelétrica (IEF-PAGE) e coloração para atividade de lipase

A focalização isoelétrica (IEF-PAGE) foi realizada em um sistema Multiphor II (Pharmacia LKB) usando géis pré-moldados Servalyt™ Precotes™ com um gradiente de pH imobilizado de 3 a 10 (Serva, Heidelberg, Alemanha). Os géis para determinação de proteína foram corados com prata.

Num único gel pré-moldado é possível aplicar até 12 amostras, sendo que a sequência das amostras aplicada da esquerda para direita foi: Marcador de massa molecular (MM), lipase purificada para determinação do perfil de proteína, espaço, lipase purificada para determinação de atividade, espaço e sete amostras da lipase purificada, sendo estas últimas isoladas após isoelétrica focalização e utilizadas para posterior separação em gel SDS-PAGE.

Logo após a resolução do gel IEF-PAGE, este foi cortado em 3 partes. A primeira parte contendo o marcador de massa molecular e lipase purificada para determinação de proteína e foi corada por prata. A segunda parte foi sobreposta em gel agarose para determinação da atividade de lipase. A terceira parte foi incubada em solução contendo 50% de metanol, 10% de ácido acético e 0,5 mL/L de formalina 37% para fixação das proteínas no gel.

Para detecção da atividade de lipase, um gel de agarose 2% contendo 0,5% Tween 80, 0,01% CaCl_2 , em tampão fosfato 50 mM, pH 8,0, foi preparado. Após focalização, o gel IEF-PAGE foi incubado sobre o gel de agarose-Tween 80 a 37°C até visualização da atividade hidrolítica [4].

Após detecção da atividade de lipase, os fragmentos presentes na terceira parte do gel IEF-PAGE, correspondentes às lipases detectados no gel de agarose-Tween 80, foram isolados com auxílio de um bisturi novo. Os sete fragmentos correspondentes a cada lipase foram incubados a 95 °C por 5 min em tampão de amostra, e então estes fragmentos aplicados diretamente sobre o gel SDS-PAGE.

Coloração para detecção de proteína em gel SDS-PAGE ou IEF-PAGE

Coomassie Brilliant Blue

O gel foi corado em solução “Coomassie Brilliant Blue” em uma mistura de 400 ml de metanol, 100 ml de ácido acético glacial, 500 mg de Coomassie Brilliant Blue e 500ml de água destilada por 12 horas. A descoloração foi realizada após lavagens sucessivas em solução contendo 400 ml de metanol, 100 ml de ácido acético glacial e 500 ml de água destilada. Posteriormente, o gel foi fixado com ácido acético 7%.

Prata

O gel foi fixado por pelo menos uma hora na solução 1 (50% de metanol, 10% de ácido acético e 0,5 mL/L de formalina 37% (também conhecido por formaldeído 37%)). Em seguida o gel foi lavado duas vezes de 10 min na solução 2 (álcool etílico 30%). O gel foi então incubado por 1 min na solução 3 (0,2 g/L de tiosulfato de sódio), e lavado três vezes de 20 seg em água destilada. Posteriormente, o gel foi incubado por 20 min na solução 4 (2,0 g/L de nitrato de prata e 0,75 mL/L de formalina 37%), e lavado duas vezes de 20 seg em água destilada. As bandas de proteínas foram então reveladas na solução 5 (60g/L carbonato de sódio, 0,5 mL/L de formalina 37% e 1,0 mg/L de tiosulfato de sódio). Finalmente, gel foi fixado na solução 6 (10% de metanol e 12% de ácido acético).

As soluções 1, 2 e 6 são estáveis à temperatura ambiente, contudo as soluções 3, 4 e 5 devem ser preparadas pouco antes de serem utilizadas.

Determinação da atividade de lipase

A atividade de lipase foi determinada usando o substrato *p*-nitrofenilpalmitato (pNPP) 0,1 mM. O substrato foi dissolvido em 2% de Triton X-100 sob agitação branda a cerca de 55 °C. A mistura de 200 µL de pNPP 0,1 mM em 2% de Triton X-

100, 750 μL de tampão fosfato pH 8,0 20 mM e 50 μL de enzima (na diluição necessária) foi incubada a 40 °C por 10 min. A reação foi paralisada com 2 mL de etanol 96%. A quantidade de produto formado, *p*-nitrofenol, foi determinada por absorção no visível a 420 nm. O branco da reação foi preparado nas mesmas condições com enzima previamente autoclavada para sua total inativação.

Uma unidade de lipase (1U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de *p*-nitrofenol por minuto ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$), nas condições descritas acima.

Efeito do pH na atividade de lipase

O efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da enzima foram estudados usando *p*NPP como substrato. Diferentes valores de pH entre 3,5 e 11,0 foram avaliados. A estabilidade foi determinada incubando 50 μL da enzima em diferentes valores de pH durante 1h a 30 °C, e a atividade residual determinada a 40 °C, pH 8,0. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Os tampões na concentração de 20 mM foram: valores de pH 3,6; 4,6 e 5,6 (Acetato); valores de pH 6,0; 7,0 e 8,0 (Fosfato); pH 9,0 (Tris-HCl); valores de pH 9,5; 10,0 e 10,5 (Carbonato).

Efeito da temperatura na atividade de lipase

O efeito da temperatura sobre a atividade de lipase foi estudado determinando a atividade da enzima em diferentes temperaturas entre 10 e 70 °C em pH 8,0, usando tampão Tris-HCl 20 mM. A termoestabilidade da enzima foi determinada pré-incubando a enzima entre 30 e 80°C por 1 h. Após isto, a atividade de lipase foi determinada como descrito acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Purificação da lipase alcalina extracelular de *Fusarium oxysporum*

A lipase alcalina extracelular do *Fusarium oxysporum* foi primeiramente concentrada com 70% de saturação com sulfato de amônio, e posteriormente, purificada através cromatografia de troca aniônica (DEAE Sepharose – Figura 1) seguida de uma coluna de gel filtração (Sephacryl-200 – Figura 2).

Na cromatografia de troca aniônica observou-se dois picos de atividade, Pico 1 e Pico 2 (Figura 1). Como as frações correspondentes ao segundo pico somaram 92% da atividade de lipase total após cromatografia, apenas estas frações foram concentradas para o próximo passo de purificação.

HOSHINO *et al.* [2] utilizaram uma coluna de troca aniônica forte, Q-Sepharose, como primeiro passo cromatográfico para purificação de uma lipase de *Fusarium oxysporum*, contudo na cromatografia da preparação de lipase de *F. oxysporum* da linhagem 152B nessa resina ocorreu perda acentuada da atividade enzimática, comparada com a purificação em coluna de trocador aniônico fraco DEAE-Sepharose (dados não mostrados).

Entre o segundo e o terceiro passos de purificação, a amostra enzimática foi filtrada com membrana Millipore® de 45 µm. Nesta etapa ocorreu uma perda de 3 vezes de atividade de lipase e mesma proporção de perda de proteína (Tabela 2). Isto explica uma proporção da perda de atividade de lipase de 17 vezes que ocorreu após cromatografia de troca iônica (Tabela 1).

Após cromatografia de gel filtração, a lipase de *Fusarium oxysporum* foi purificada 20 vezes com uma atividade específica de 138 U/mg (Tabela 1), usando *p*-nitrofenilpalmitato como substrato.

Tabela 1: Resumo dos passos de purificação da lipase de *Fusarium oxysporum*

Passos	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
1. Extrato Bruto	63765,61	9344,61	6,82	1,00	100,00
2. Precipitação com Sulfato de Amônio	25115,10	428,57	58,60	8,59	39,39
3. DEAE Sepharose	1510,20	18,99	79,51	11,65	2,37
4. Sephacryl - 200	839,47	6,05	138,87	20,35	1,32

Tabela 2: Valores de atividade total, proteína total, atividade específica e purificação verificados após filtração com membrana Millipore® de 45 µm.

Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Purificação (vezes)
9414,17	160,71	58,58	8,58

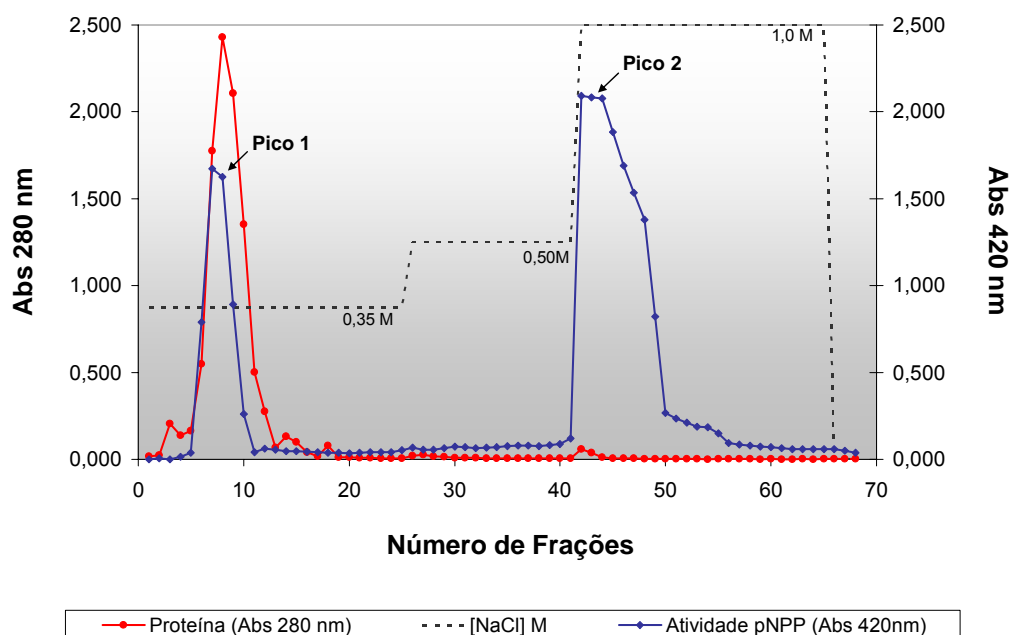


Figura 1: Cromatograma da purificação da lipase de *Fusarium oxysporum* em coluna de troca aniônica, DEAE-Sepharose (fluxo inicial de 0,5 mL/min até a fração 20; fluxo entre as frações 21 à 68 de 2,0 mL/min).

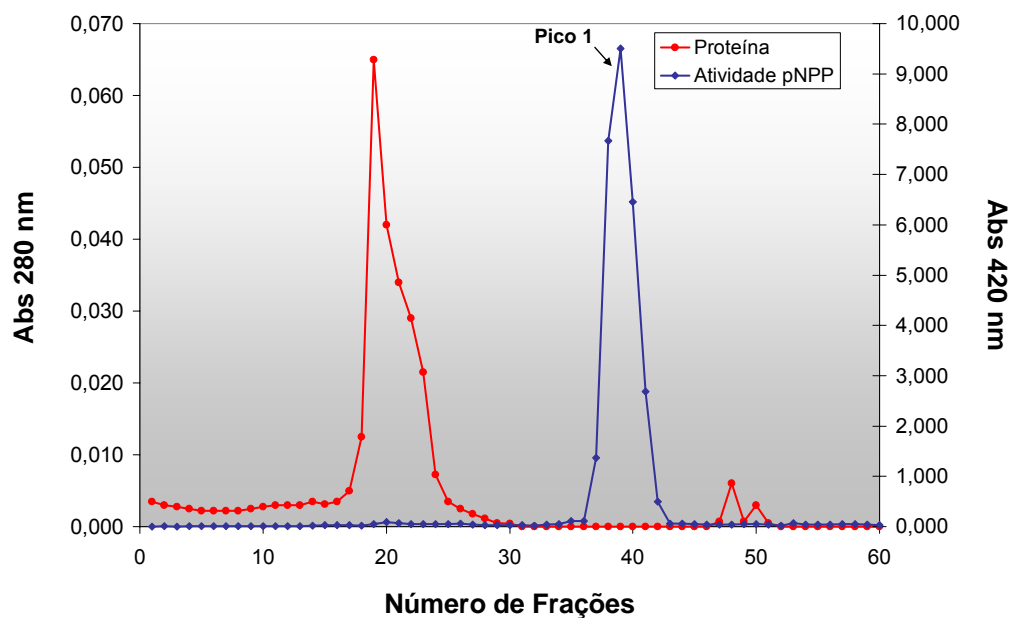


Figura 2: Cromatograma da purificação (Pico 2 proveniente da coluna DEAE-Sepharose) da lipase de *Fusarium oxysporum* em coluna de gel filtração, Sephacryl-200 (fluxo de 0,33 mL/min).

A figura 3 ilustra o perfil de proteínas em gel SDS-PAGE das preparações enzimáticas obtidas durante as etapas de purificação da lipase. A lipase purificada em coluna de Sephacryl-200 (Pico 1, figura 2) apresentou uma única banda, de massa molecular ao redor de 30 kDa. A lipase de *F. oxysporum* f. sp. *Lini*, purificada por HOSHINO *et al.* [2], apresentou a mesma massa molecular, enquanto as lipases do *F. heterosporum* apresentaram massas molares equivalentes a 31 e 34 kDa.

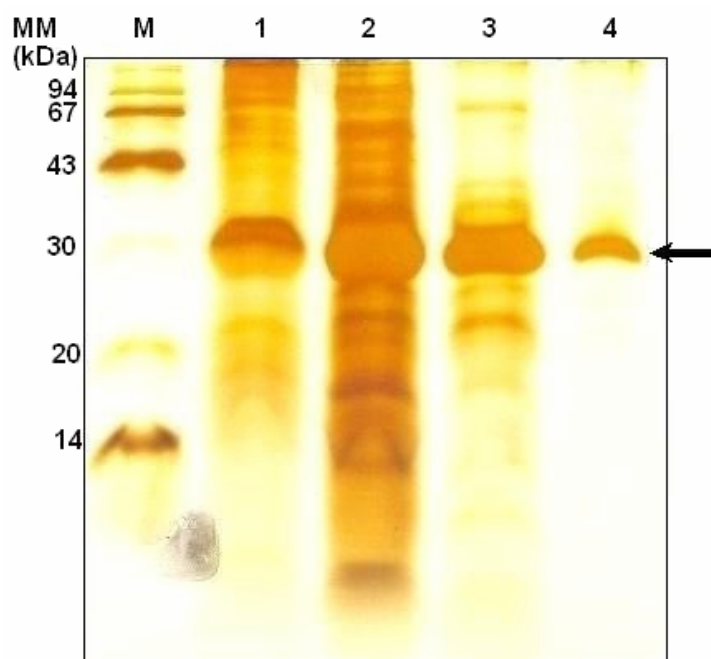


Figura 3: Separação em SDS-PAGE (gel de poliacrilamida em condições denaturantes) da lipase de *Fusarium oxysporum* nos vários passos de purificação. **M:** Marcador de Massa Molecular; **1:** Extrato Bruto (136,73 µg de proteína); **2:** Precipitação com Sulfato de Amônio (177,68 µg de proteína); **3:** DEAE-Sepharose (Pico 2; 75,60 µg de proteína); **4:** Sephacryl-200 (Pico 1; 42,65 µg de proteína).

Em contraste com a eletroforese em gel de SDS-PAGE onde uma única banda foi detectada, em gel IEF-PAGE várias bandas de proteína foram observadas para a lipase purificada através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Na Figura 4B, observa-se a amostra purificada

em Sephacryl-200 (Pico 1, figura 2) corada com prata. O arraste observado nesta amostra de proteína, possivelmente ocorreu devido à concentração da amostra após a separação na coluna de gel filtração e à alta sensibilidade do método de prata. Semelhante arraste pode ser observado no marcador molecular em vários pontos (Figura 4A).

Na Figura 4C, um gel de agarose contendo Tween 80 como substrato foi sobreposto ao gel IEF-PAGE para verificar a atividade lipolítica da amostra purificada em Sephacryl-200, correspondente ao Pico 1 (Figura 2). Esta figura mostra a presença de três lipases *Lip 1*, *Lip 2* e *Lip 3* com pontos isoelétricos 7,15, 6,84 e 4,55, respectivamente, as quais provavelmente são isoenzimas.

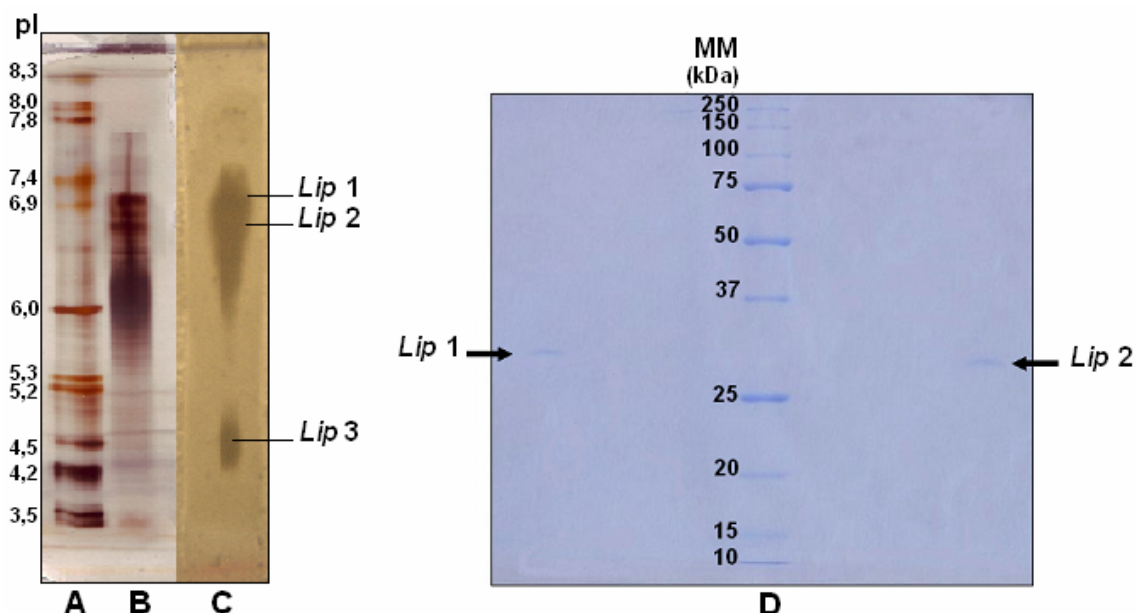


Figura 4: Isoelétrica focalização (IEF-PAGE) e eletroforese em gel de poliacrilamida em condições denaturante (SDS-PAGE) das lipases *Lip 1*, *Lip 2* e *Lip 3* isoladas de *Fusarium oxysporum*. **A:** Marcador de Ponto Isoelétrico (corado com prata); **B:** proteína purificada após cromatografia em coluna Sephacryl-200 (corada com prata); **C:** IEF-PAGE sobreposto em gel de agarose com Tween 80 para determinação de atividade lipolítica; **D:** SDS-PAGE das lipases *Lip 1* e *Lip 2*, com o Marcador de Massa Molecular no centro do gel.

As massas moleculares das *Lip 1* e *Lip 2* foram determinadas usando o Marcador de massa molecular para o gel SDS-PAGE, do qual foi construída uma curva padrão com os log das massas moleculares na ordenada “y” e os Rfs (Relativa mobilidade) de cada proteína usada como marcador na ordenada “x” (Figura 5). Através da equação da reta, e os Rfs das duas lipases, foi possível calcular as massas moleculares das proteínas *Lip 1* e *Lip 2*, 30 e 29 kDa, respectivamente. HOSHINO et al. [2] isolaram uma única lipase extracelular de *Fusarium oxysporum* que também revelou ter 30 kDa de massa molecular. A massa molecular da *Lip 3* não foi determinada.

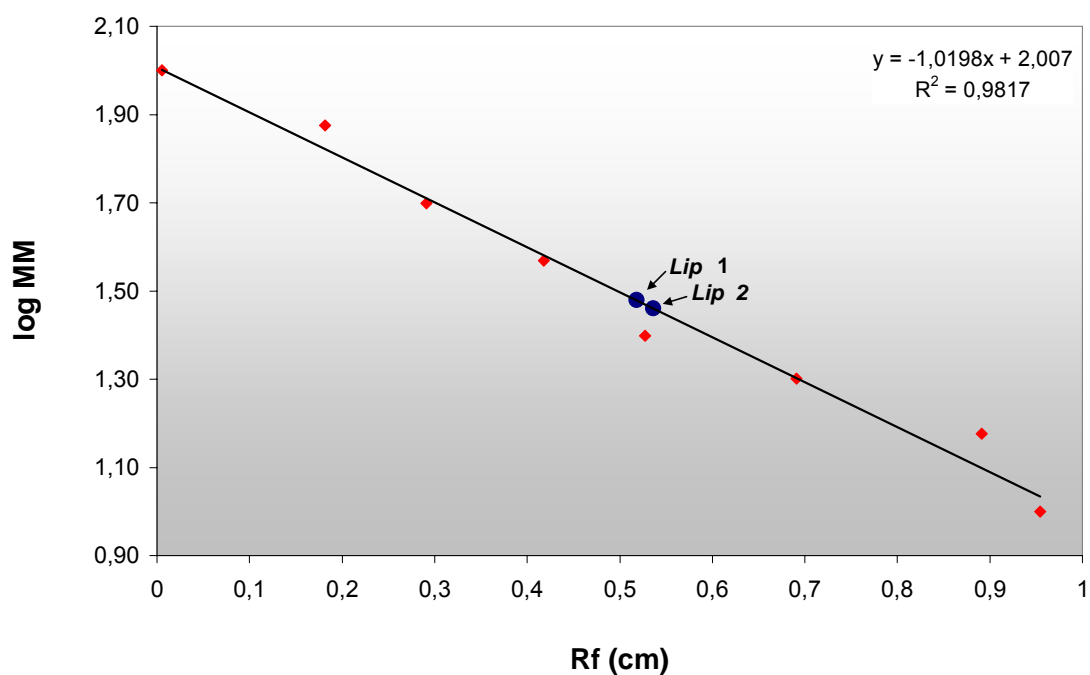


Figura 5: Traçado do Rf (Relativa mobilidade) versus log PM das proteínas padrões abrangendo de 10 a 100 kDa, separado em gel SDS-PAGE (12% de concentração uniforme), como mostrado na Figura 4.

A quantidade de proteína da lipase *Lip 3* foi insuficiente para visualização no gel SDS-PAGE por coloração com Coomassie Brilliant Blue, e por este motivo sua massa molecular não foi determinada, e esta proteína não foi isolada para seqüenciamento.

As duas lipases com maior atividade hidrolítica no gel de agarose com Tween 80, *Lip 1* e *Lip 2* foram então recortadas do gel IEF-PAGE e aplicadas em gel SDS-PAGE (Figura 4D) para isolamento e seqüenciamento.

Os resultados do TOF MS ES (Electrospray Time-of-Flight Mass Spectrometer) das duas lipases *Lip 1* e *Lip 2* de *Fusarium oxysporum* mostram que as duas enzimas possuem o mesmo perfil cromatográfico, ou seja as mesmas séries de seqüências de aminoácidos, e por este motivo, apenas a *Lip 1* foi seqüenciada. Estes resultados também confirmam a possibilidade destas duas lipases serem isoformas.

As cinco seqüências de aminoácidos determinadas foram:

Seq 1: **LPPLVFGYR**

Seq 2: **DAALVVGSVVGTK**

Seq 3: **AVTVTTQDLSNFR**

Seq 4: **DGFPPDLITYGSPR**

Seq 5: **VGNDFFANFVTQQAGAEYR**

A Figura 6 apresenta um resumo das análises realizadas com o programa Blastp (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) das cinco seqüências encontradas para a lipase *Lip 1* de *Fusarium oxysporum*. O estudo comparativo entre as cinco seqüências de aminoácidos verificou-se que a *Lip 1* possui de 80 a 100% de identidade com a lipase de *Fusarium heterosporum*. Cada seqüência foi analisada individualmente, e

o resultado das proteínas que produziram significativo alinhamento significativo está ilustrado (Figura 6), como também o alinhamento da *Lip 1* com a lipase de *F. heterosporum* (Figura 7).

Os “scores” são pontuações dadas aos alinhamentos entre as seqüências comparadas. Quanto maior forem os “scores”, melhores serão os alinhamentos. O primeiro critério de pontuação é um alinhamento sem “gaps”, que consiste simplesmente em um par de segmentos de comprimento iguais, um de cada uma das duas seqüências que estão sendo comparadas. O outro critério corresponde aos aminoácidos que não se diferem entre os alinhamentos. A somatória das pontuações apresentadas a estes critérios determina o “score”. Para analisar o quão alto um “score” é provável ser alto por acaso, um modelo de seqüências aleatórias é necessário. O “E-value” é outro valor estatístico dado para a análise dos alinhamentos feitos pelo “Blast”. Através do “E-value” é possível avaliar o quão similares são as seqüências alinhadas. Quanto menor exponencialmente for o “E-value”, maior a similaridade entre as seqüências.

O alinhamento da seqüência de aminoácidos da Lipase de *F. heterosporum* com as cinco seqüências obtidas para a lipase de *F. oxysporum* foi realizado com o auxílio do programa ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw) (Figura 7).

Seq 1: LPPLVFGYR				
Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value
gi 33621223 gb AAQ23181.1 	extracellular lipase [Gibberella zeae]		30.8	5.6
gi 42552708 gb EAA75551.1 	hypothetical protein FG05906.1 [Gi...		30.8	5.6
gi 55642435 ref XP_510521.1 	PREDICTED: similar to hypothetical		29.9	10
gi 11990253 emb CAC19602.1 	extracellular lipase [Nectria haemat		29.5	14
gi 1000397 gb AAB34680.1 	lipase [Fusarium heterosporum]		29.5	14
Seq 2: DAALVVGSVVGTK				
Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value
gi 11990253 emb CAC19602.1 	extracellular lipase [Nectria haemat		30.8	6.2
gi 1000397 gb AAB34680.1 	lipase [Fusarium heterosporum]		30.8	6.2
gi 50951722 gb AAT89423.1 	ABC transporter, permease protein ...		26.1	158
Seq 3: AVTVTTQDLSNFR				
Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value
gi 11990253 emb CAC19602.1 	extracellular lipase [Nectria haemat		38.0	0.042
gi 1000397 gb AAB34680.1 	lipase [Fusarium heterosporum]		38.0	0.042
gi 76640437 ref XP_596855.2 	PREDICTED: hypothetical protein XP_		26.5	118
Seq 4: DGFPFDLYTYGSPR				
Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value
gi 11990253 emb CAC19602.1 	extracellular lipase [Nectria haemat		40.1	0.010
gi 1000397 gb AAB34680.1 	lipase [Fusarium heterosporum]		40.1	0.010
gi 33621223 gb AAQ23181.1 	extracellular lipase [Gibberella zeae]		31.6	3.5
Seq 5: VGNDFFANFVTQQAGAEYR				
Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value
gi 11990253 emb CAC19602.1 	extracellular lipase [Nectria haemat		52.4	2e-06
gi 1000397 gb AAB34680.1 	lipase [Fusarium heterosporum]		52.4	2e-06
gi 12718379 emb CAC28687.1 	probable triacylglycerol lipase p...		29.5	15

Figura 6: Resumo das seqüências que produziram alinhamento significativo com as seqüências de aminoácidos obtidas da *Lip 1* de *F. oxysporum*.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

F. heterosporum Seq3	MMLVLSLLSIIAFTAAGPVPSVDENTRVLEHRAVTVTQTQDLSNFRFYLQHADAAYCNFNT	60
	-----AVTVTTQDLSNFR-----	11

F. heterosporum Seq2	AVGKPVHCSAGNCPDIEKDAAIVVGSVVGTKTGIGAYVATDNARKEIVSVRGSINVRNW	120
	-----DAALVVGSVVGTK-----	11
	:**	
F. heterosporum	ITNFNFGQKTCDLVAGCGVHTGFLDAWEEVAANVKAASAAKTANPTFKFVVTGHSGLGA	180

F. heterosporum Seq4/5/1	VATIAAAYLRKDGFPFDLYTYGSPRVGNDFANFVTQQTGAEYRVTHGDDPVPRLPPIVF	240
	-----DGFPPFDLYTYGSPRVGNDFANFVTQQTGAEYR-----LPPLVF	6
	*****:*****	***:***
F. heterosporum	GYRHTSPEYWLNGGPLDKDYTVTEIKVCEGIANVMCNGGTIGLDILAHITYFQSMATCAP	300
	GYR-----	9

F. heterosporum	IAIPWKRDMSEEELEKKLTQYSEMDQEFVKQMI	333

Figura 7: Alinhamento das cinco seqüências obtidas para a *Lip 1* de *F. oxysporum* com a seqüência completa da lipase de *F. heterosporum*, usando como ferramenta o programa Clustal W.

Caracterização da lipase de *Fusarium oxysporum* purificada após gel filtração

Após purificação, a lipase de *Fusarium oxysporum* foi caracterizada quanto ao pH e temperatura de atividade e estabilidade. As Figuras 8 e 9 mostram que esta enzima possui maior atividade hidrolítica em pH 8,0 e a 40°C e é estável em pH alcalino e até 40°C. É pertinente observar que a lipase bruta apresentou atividade ótima a 50°C e reteve 93% de atividade após incubação a 60°C por 1h.

A lipase purificada de *F. oxysporum* f. sp. *lini* mostrou alta atividade a 42°C e apresentou uma redução de cerca de 50% de atividade a 60°C quando a solução de enzima foi incubada por 1h. A enzima apresentou atividade ótima em pH 7,0 e estabilidade na faixa de pH 8,0 e 9,0 [2].

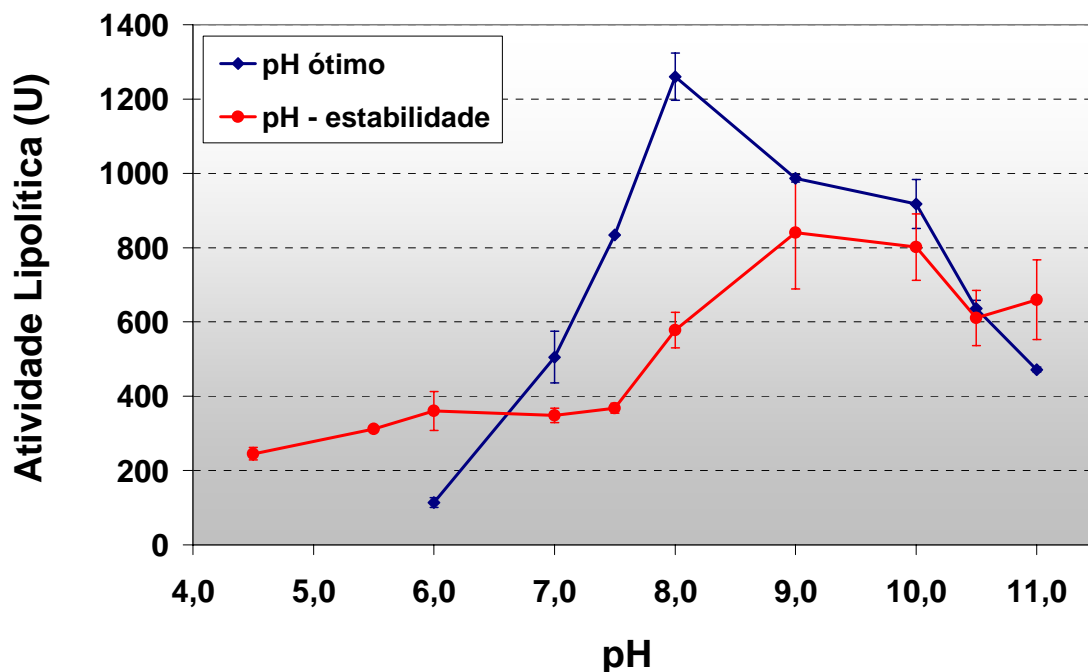


Figura 8: Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da lipase purificada de *F. oxysporum*. Os experimentos foram realizados em triplicatas e as barras representam o desvio padrão.

Diferentemente dos dados acima, a lipase de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* não foi muito termoestável, perdendo 70% de atividade após incubação por 15 min a 50°C [16]. A lipase de *F. solani* também apresentou baixa termoestabilidade, sendo inativada a temperaturas acima de 40°C [12].

Alguns trabalhos têm sido realizados para aumentar a termoestabilidade de lipases para algumas aplicações industriais. Nagao et al. [14] clonaram e introduziram uma mutação pontual em uma lipase de *F. heterosporum*, para expressar uma lipase mais termoestável em *S. cerevisiae*. Os autores verificaram que uma pró-lipase mutante foi mais estável ao aquecimento do que a lipase do microrganismo selvagem, e que esta mutação produziu unicamente lipases termoestáveis.

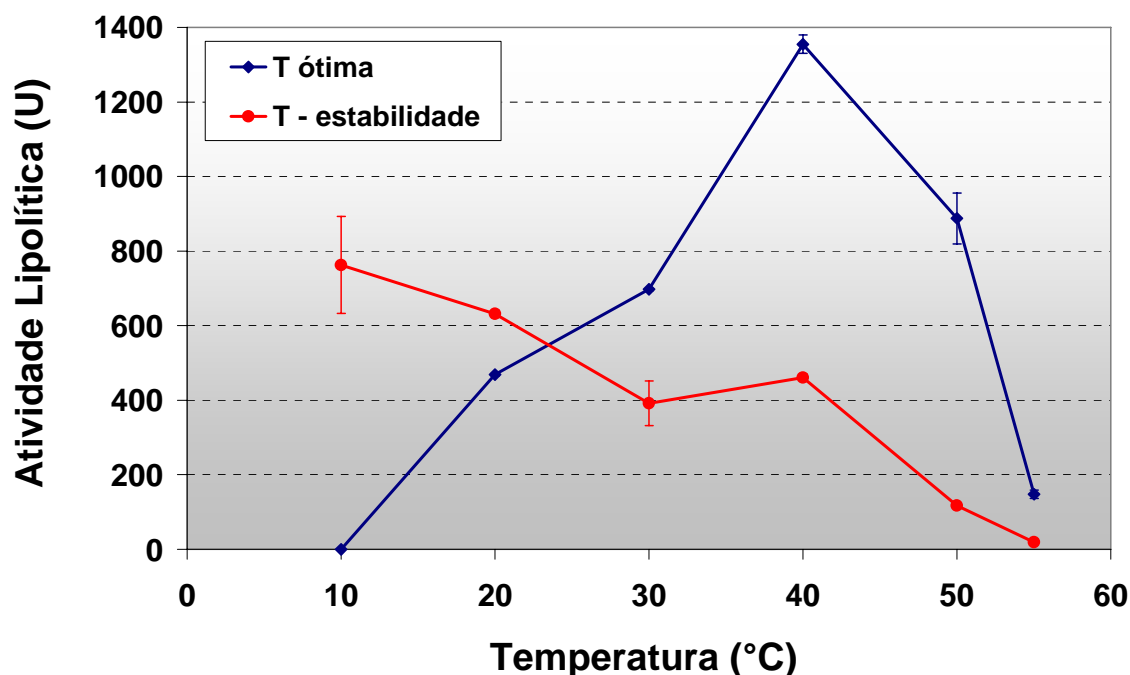


Figura 9: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da lipase purificada de *F. oxysporum*. Os experimentos foram realizados em triplicatas e as barras representam o desvio padrão.

CONCLUSÕES

A lipase de *Fusarium oxysporum* foi purificada 20 vezes com rendimento de 1,32 % após precipitação com sulfato de amônio, cromatografia em colunas de DEAE-Sephacryl-200. A lipase purificada apresentou uma única em de gel SDS-PAGE, mas no gel IEF-PAGE foram detectadas três isoformas, *Lip 1*, *Lip 2* e *Lip 3*. O seqüenciamento de aminoácidos da *Lip 1* mostrou que esta enzima tem alta similaridade com a lipase de *F. heterosporum*.

Após purificação, a lipase purificada de *F. oxysporum* apresentou atividade ótima em H 8,0 e a 40 °C. A enzima mostrou-se estável em pH alcalino e em temperaturas até 40°, mantendo sua potencialidade para aplicação em detergentes.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, do Instituto de Biologia da Unicamp, e seu aluno Márcio Miranda por auxiliar na utilização do equipamento de FPLC. Também ao Prof. Dr. Ralf Berger, da Universidade de Hanover, Alemanha, por prover materiais e ferramentas para as técnicas de IEF-PAGE e seqüenciamento de aminoácidos da enzima isolada. Ao apoio financeiro provido pelo CNPq e RECOPE/Finep.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

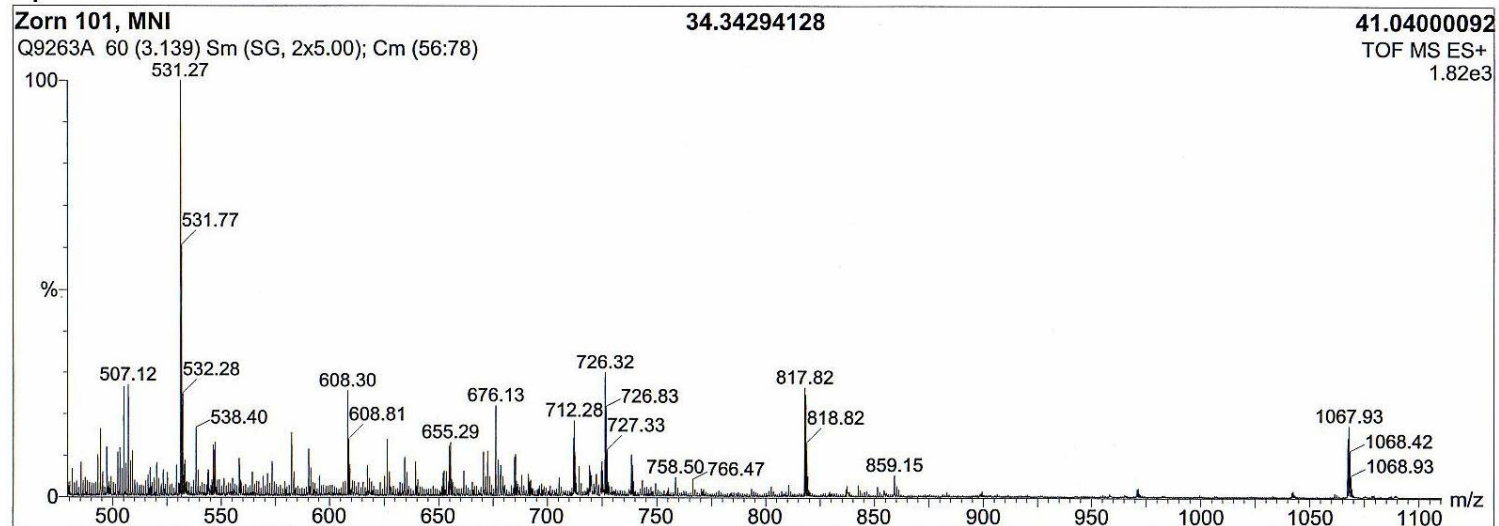
1. CASTRO-OCHOA, L.D.; RODRÍGUES-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 37, p. 648-654, 2005.
2. HOSHINO, T.; SASAKI, T.; WATANABE, Y.; NAGASAWA, T.; YAMANE, T. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 56, n. 4, p. 660-64, 1992.
3. JAEGER, K.-E. & REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **TIBTECH**, v. 16, p.396-403, 1998.
4. KAMIMURA, E.S.; MENDIETA, O.; SATO, H.H.; PASTORE, G.; MAUGERI, F. Production of lipase from *Geotrichum* sp. and adsorption studies on affinity resin. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 16, n. 2, p. 103-112, 1999.
5. KOBLITZ, M.G.B. & PASTORE, G.M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 2, p.287-292, 2004.

6. KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S.S. GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expr. Purif.**, v. 41, p.38-44, 2005
7. LIN, S-F.; CHIOU, C-M.; TSAI, Y-C. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Biotechnol. Lett.**, v. 17, n.9, p.956-962, 1995.
8. LIN, S.-F.; CHIOU, C.-M.; YEH, C.-M.; TSAI, Y.-C. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 3, p. 1093-1095, 2004.
9. LINKE, D.; ZORN, H.; GERKEN, B.; PARLAR, H.; BERGER, R.G. Foam fractionation of exo-lipases from a growing fungus (*Pleurotus sapidus*). **Lipids**, v. 40, n. 3, p.323-327, 2005.
10. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; LEWIS FARR, A.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p.265-275, 1951.
11. MACEDO, G.M.; PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. **Rev. Microbiol.**, v. 28, p. 90-95, 1997.
12. Maia, M.M.D.; Morais, M.M.C.; Morais Jr., A.M.; Melo, E.H.M.; Lima Filho, J.L. production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani*. **Braz. J. Microbiol.**, v.30, p.304-309, 1999.
13. MARTÍNEZ, A. & SOBERÓN-CHÁVEZ, G. Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.56, p.31-735, 2001.
14. NAGAO, T.; SHIMADA Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Increase in stability of *Fusarium heterosporum* lipase. **J. Mol. Catal., B Enzym.**, 17:125-132, 2002.

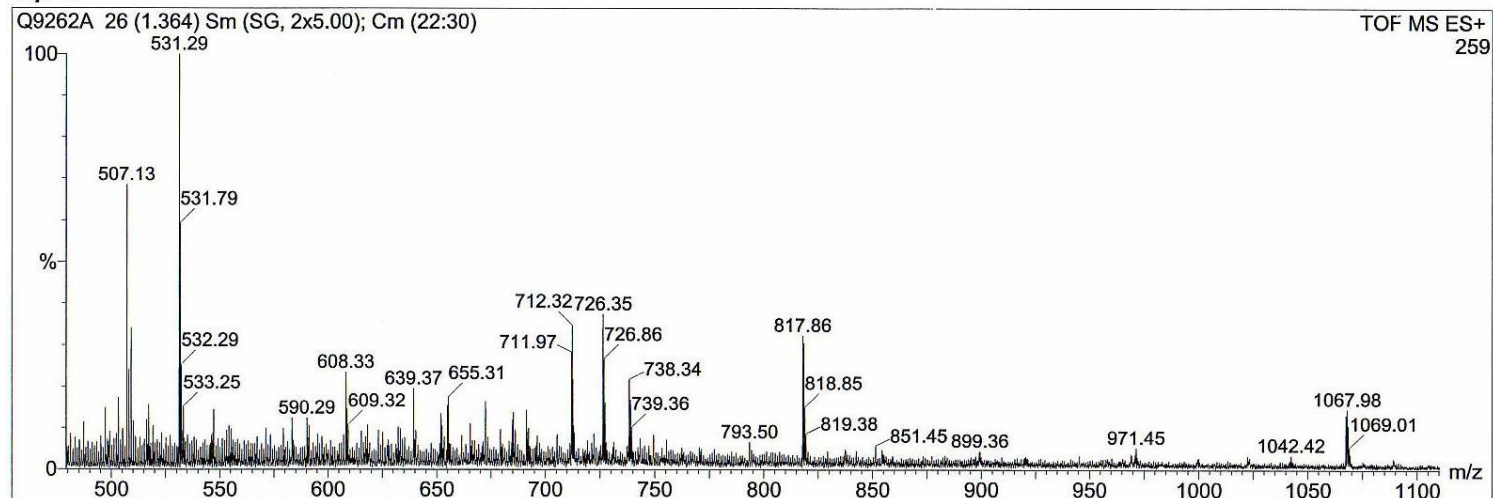
15. PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 29, p.119-131, 1999.
16. RAPP, P. Production, regulation, and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Enzyme Microb. Technol.**, 17:832-838, 1995.
17. SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnol. Adv.**, v.19, p. 627-662, 2001.
18. SHARMA, R.; SONI, S.K.; VOHRA, R.M.; GUPTA, L.K.; GUPTA, J.K. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochem.**, v. 37, p.1075-1084, 2002.
19. SAXENA, R.K.; DAVIDSON, W.S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochem.**, v. 39, p.239-247, 2003.
20. TAIPA, M.A.; AIRES-BARROS, M.R.; CABRAL, J.M.S. Purification of lipases. **J. Biotechnol.**, v.26, p. 111-142, 1992.
21. National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, May, 2006.
22. EMBL-EBI – European Bioinformatics Institute - www.ebi.ac.uk/clustalw, May, 2006.

Anexos: TOF MS ES das duas lipases *Lip 1* e *Lip 2* de *Fusarium oxysporum*.

Lip 1



Lip 2



Anexo 1

BioLynx - Peptide Sequencing Report

PepSeq file: C:\PepSeq\Zom101-2133.psq
Printed: Mon May 09 16:26:31 2005

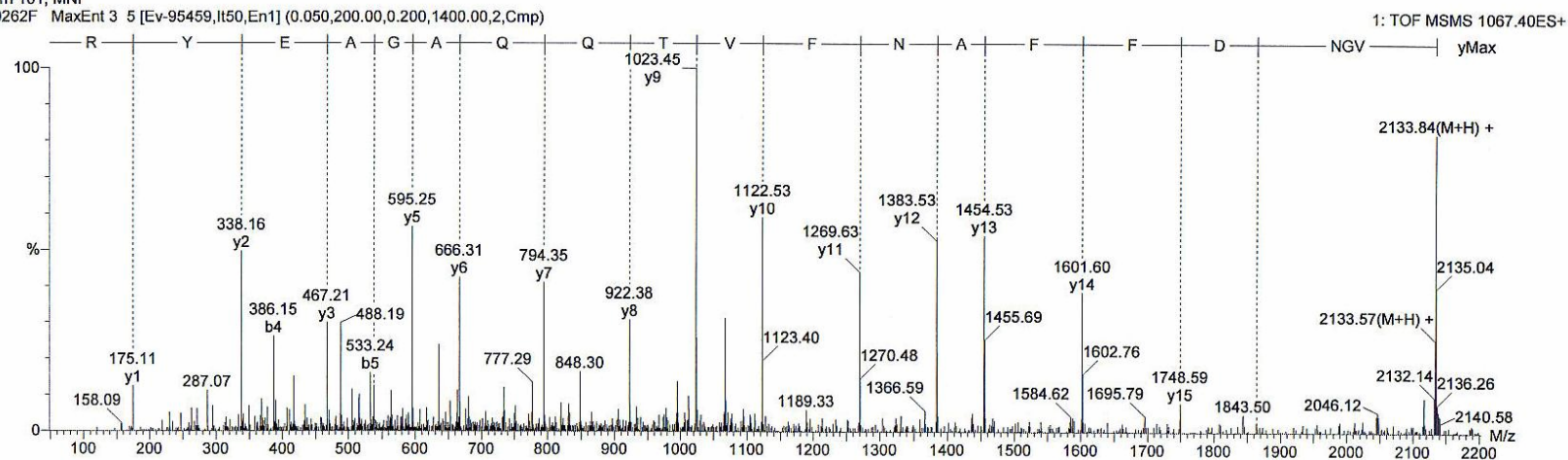
Page 1

Observed MW: 2132.8323 Precursor ion charge state: 1
M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 13 (1.500%)

a	72.08	129.10	243.15	358.17	505.24	652.31	723.35	837.39	984.46	1083.53	1184.57	1312.63	1440.69	1511.73	1568.75	1639.79	1768.83
	---	---	---	0.01	0.03	0.07	0.01	0.04	0.05	0.10	---	---	---	---	---	-0.03	---
b	100.08	157.10	271.14	386.17	533.24	680.30	751.34	865.38	1012.45	1111.52	1212.57	1340.63	1468.69	1539.72	1596.74	1667.78	1796.82
	---	0.00	0.04	0.02	-0.01	-0.01	0.01	0.10	-0.02	-0.00	---	0.05	0.10	0.09	---	---	0.20
	Val	Gly	Asn	Asp	Phe	Phe	Ala	Asn	Phe	Val	Thr	Gln	Gln	Ala	Gly	Ala	Glu
y	2134.00	2034.93	1977.91	1863.87	1748.84	1601.77	1454.70	1383.67	1269.62	1122.55	1023.49	922.44	794.38	666.32	595.28	538.26	467.23
	---	---	---	0.18	0.25	0.18	0.17	0.13	-0.01	0.03	0.03	0.06	0.03	0.01	0.03	0.03	0.01
z	2116.97	2017.90	1960.88	1846.84	1731.81	1584.74	1437.67	1366.64	1252.59	1105.52	1006.46	905.41	777.35	649.29	578.25	521.23	450.20
	---	---	---	---	0.22	0.12	0.06	0.05	0.15	-0.02	0.12	0.03	0.06	0.00	0.09	---	---
a	1931.89	2087.99															
	---	---															
b	1959.89	2115.99															
	---	---															
	Tyr	Arg															
y	338.18	175.12															
	0.03	0.01															
z	321.15	158.09															
	0.04	0.00															

Zom 101, MNI

Q9262F MaxEnt 3 5 [Ev-95459,It50,En1] (0.050,200.00,0.200,1400.00,2,Cmp)



Anexo 2

BioLynx - Peptide Sequencing Report

PepSeq file: C:\PepSeq\Zorn101-1634.psq

Printed: Mon May 09 15:18:56 2005

Page 1

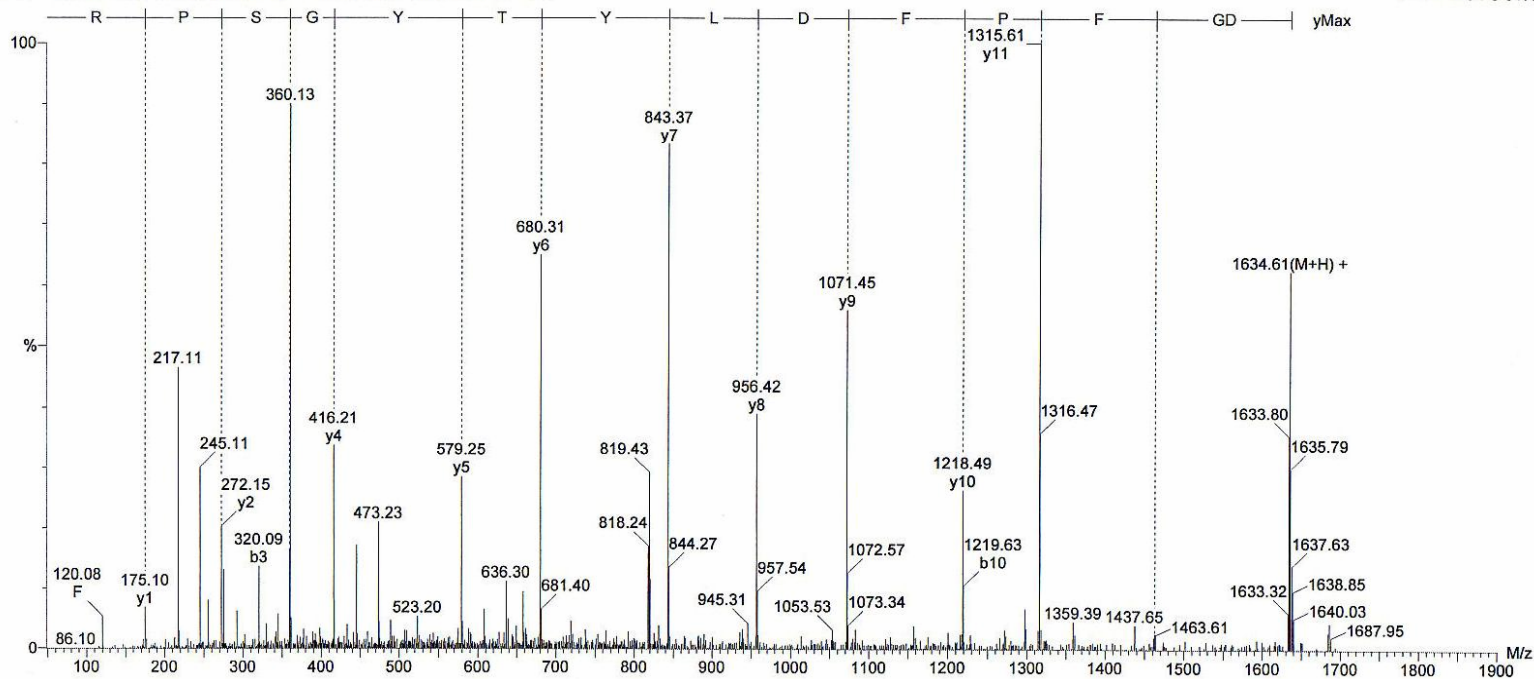
Observed MW: 1633.6022 Precursor ion charge state: 1
M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 19 (1.500%)

a	88.04	145.06	292.13	389.18	536.25	651.28	764.36	927.43	1028.47	1191.54	1248.56	1335.59	1432.64	1588.74
	---	---	0.02	0.02	0.08	---	0.05	---	---	---	---	---	---	---
b	116.03	173.06	320.12	417.18	564.25	679.27	792.36	955.42	1056.47	1219.53	1276.55	1363.58	1460.64	1616.74
	---	-0.05	0.04	0.02	0.07	0.03	0.01	0.11	---	-0.10	---	---	---	---
	Asp	Gly	Phe	Pro	Phe	Asp	Leu	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Arg
y	1634.75	1519.72	1462.70	1315.63	1218.58	1071.51	956.48	843.40	680.34	579.29	416.23	359.20	272.17	175.12
	---	---	-0.05	0.02	0.09	0.06	0.06	0.03	0.02	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02
z	1617.72	1502.69	1445.67	1298.60	1201.55	1054.48	939.45	826.37	663.31	562.26	399.20	342.17	255.14	158.09
	---	---	---	-0.03	---	---	0.12	---	---	0.05	0.06	0.02	0.01	---

Zorn 101, MNI

Q9262E MaxEnt 3 3 [Ev-80482,It50,En1] (0.050,200.00,0.200,1400.00,2,Cmp)

1: TOF MSMS 817.80ES+



Anexo 3

BioLynx - Peptide Sequencing Report

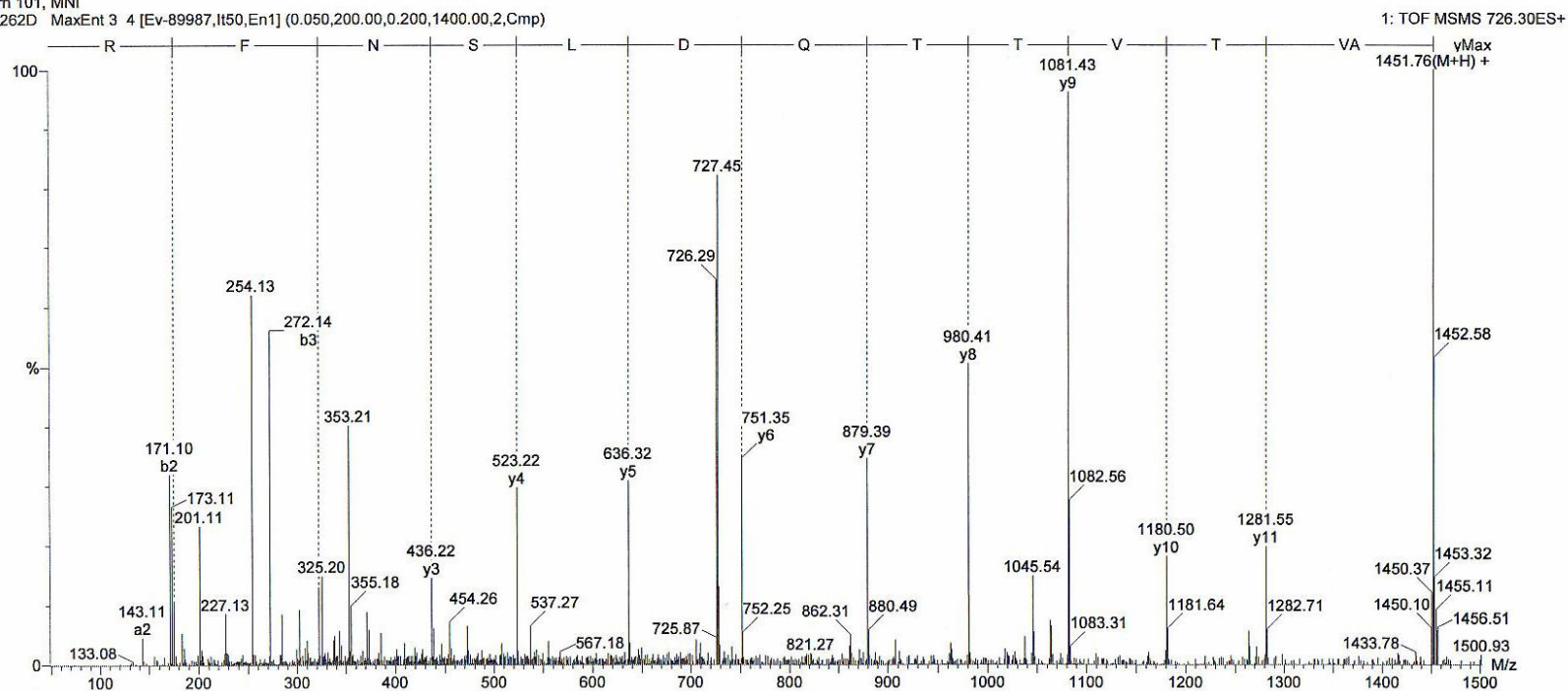
PepSeq file: C:\PepSeq\Zorn101-1451.psq
Printed: Mon May 09 15:02:55 2005

Page 1

Observed MW: 1450.7522 Precursor ion charge state: 1
M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 24 (1.500%)

a	44.05	143.12	244.17	343.23	444.28	545.33	673.39	788.42	901.50	988.53	1102.57	1249.64	1405.74
	---	0.01	0.02	0.02	0.02	0.14	---	---	---	---	---	---	---
b	72.04	171.11	272.16	371.23	472.28	573.32	701.38	816.41	929.49	1016.53	1130.57	1277.64	1433.74
	---	0.01	0.02	0.01	0.02	---	0.08	---	---	---	---	---	---
	Ala	Val	Thr	Val	Thr	Thr	Gln	Asp	Leu	Ser	Asn	Phe	Arg
y	1451.75	1380.71	1281.64	1180.60	1081.53	980.48	879.43	751.37	636.35	523.26	436.23	322.19	175.12
	---	---	0.10	0.10	0.10	0.07	0.05	0.02	0.03	0.04	0.01	0.02	0.01
z	1434.72	1363.68	1264.61	1163.57	1064.50	963.45	862.40	734.34	619.32	506.23	419.20	305.16	158.09
	---	---	-0.07	---	0.11	0.11	0.10	---	---	0.06	0.04	---	---

Zorn 101, MNI
Q9262D MaxEnt 3 4 [Ev-89987,lt50,En1] (0.050,200.00,0.200,1400.00,2,Cmp)



Anexo 4

BioLynx - Peptide Sequencing Report

PepSeq file: C:\PepSeq\Zom101-1215.psq
Printed: Mon May 09 14:47:20 2005

Page 1

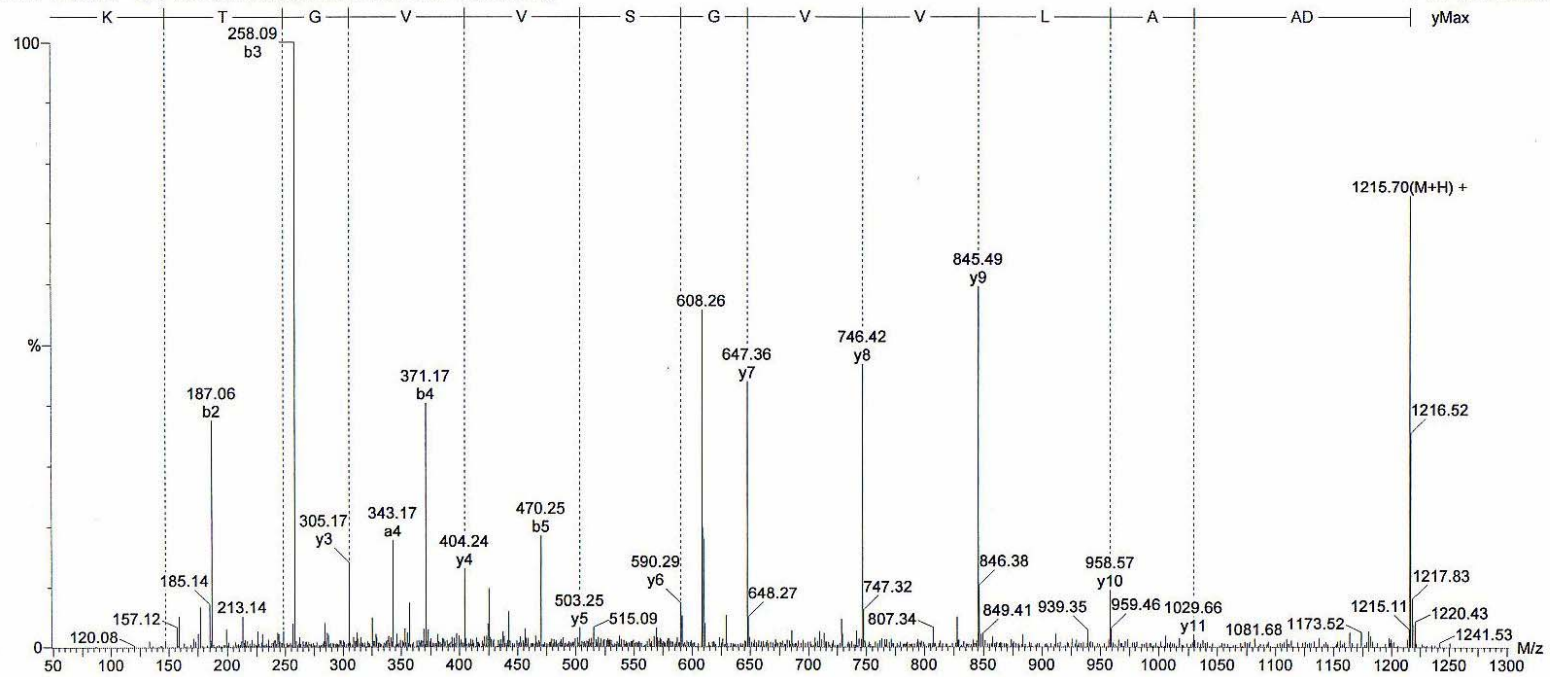
Observed MW: 1214.6943 Precursor ion charge state: 1
M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 14 (1.000%)

a	88.04	159.08	230.11	343.20	442.27	541.33	598.36	685.39	784.46	883.53	940.55	1041.59	1169.69
	---	0.01	-0.00	0.03	0.01	0.08	---	-0.04	---	0.15	---	---	---
b	116.03	187.07	258.11	371.19	470.26	569.33	626.35	713.38	812.45	911.52	968.54	1069.59	1197.68
	---	0.01	0.02	0.02	0.02	-0.01	0.02	-0.01	---	-0.00	---	---	---
	Asp	Ala	Ala	Leu	Val	Val	Gly	Ser	Val	Val	Gly	Thr	Lys
y	1215.69	1100.67	1029.63	958.59	845.51	746.44	647.37	590.35	503.32	404.25	305.18	248.16	147.11
	---	---	-0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	0.06	0.07	0.02	0.02	0.02	0.00
z	1198.66	1083.64	1012.60	941.56	828.48	729.41	630.34	573.32	486.29	387.22	288.15	231.13	130.08
	---	---	---	---	0.13	0.09	---	0.14	---	---	---	---	---

Zom 101, MNI

Q9262C MaxEnt 3 4 [Ev-41292,lt50,En1] (0.050,200.00,0.200,1400.00,2,Cmp)

1: TOF MSMS 608.30ES+



Anexo 5

BioLynx - Peptide Sequencing Report

PepSeq file: C:\PepSeq\Zom101-1061.psq
 Printed: Mon May 09 13:54:26 2005

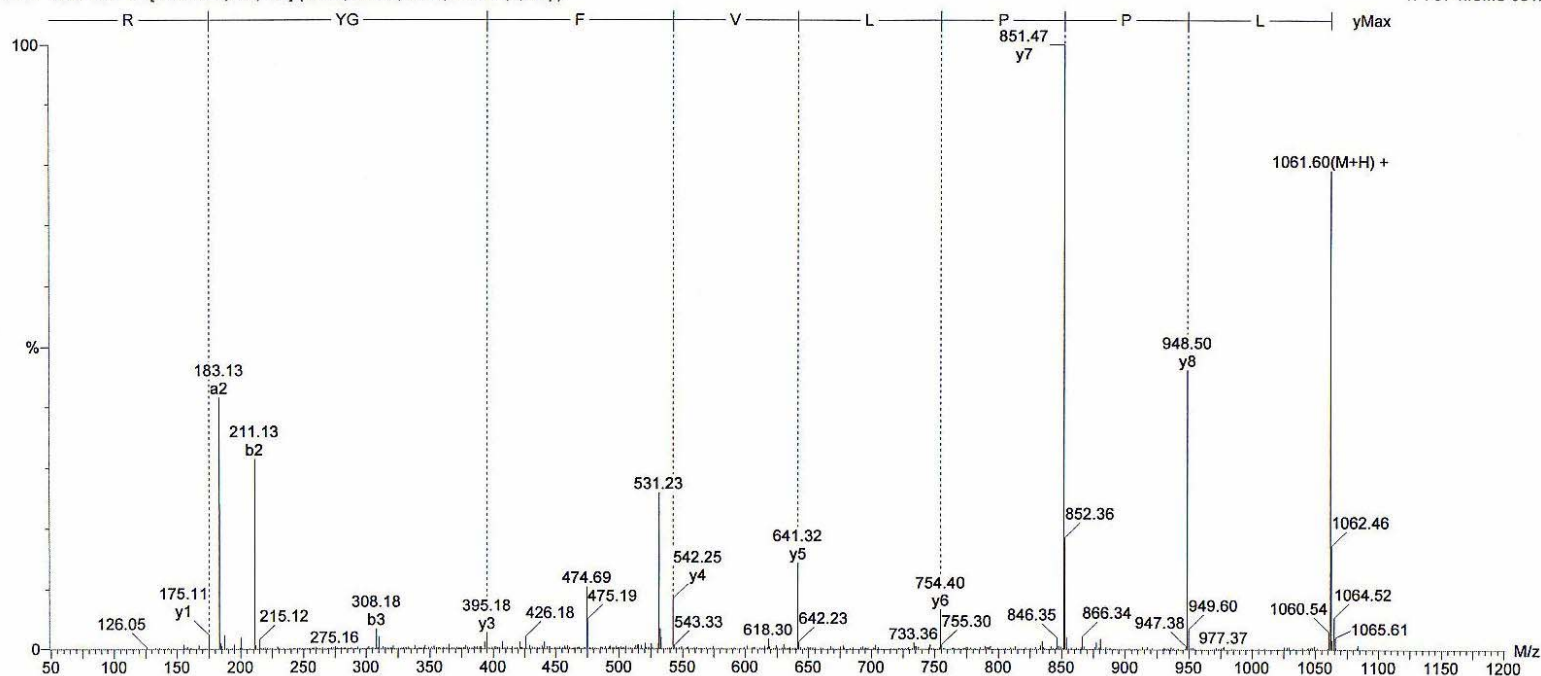
Page 1

Observed MW: 1060.5922 Precursor ion charge state: 1
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 49 (0.750%)

a	86.10	183.15	280.20	393.29	492.35	639.42	696.44	859.51	1015.61
	---	0.02	---	0.01	---	---	---	---	---
b	114.09	211.14	308.20	421.28	520.35	667.42	724.44	887.50	1043.60
	---	0.02	0.02	0.01	0.01	---	---	---	---
	Leu	Pro	Pro	Leu	Val	Phe	Gly	Tyr	Arg
y	1061.61	948.53	851.48	754.43	641.34	542.27	395.20	338.18	175.12
	---	0.03	0.01	0.03	0.02	0.02	0.02	---	0.01
z	1044.58	931.50	834.45	737.40	624.31	525.24	378.17	321.15	158.09
	---	---	0.01	---	---	-0.02	---	---	---

Zom 101, MNI
 Q9262B MaxEnt 3 10 [Ev-88685,It50,En1] (0.050,200.00,0.200,1400.00,2,Cmp)

1: TOF MSMS 531.20ES+



Anexo 6

CAPÍTULO 5: Aplicação de fracionamento com espuma para recuperação de lipase alcalina extracelular de culturas de *Fusarium oxysporum*

RESUMO

Separação usando espuma, um método eficiente na recuperação de solutos de superfícies ativas em soluções diluídas, foi aplicada com sucesso na concentração de lipase de cultura de *Fusarium oxysporum*. Os experimentos foram desenvolvidos com o surfactante não-iônico Triton X-114. Dois parâmetros foram estudados, pH e taxa de fluxo de nitrogênio. A máxima recuperação desta lipase foi verificada utilizando-se pH 8,5 e fluxo de 60 mL.min⁻¹ de N₂. Após otimização, uma taxa de enriquecimento de 8,77 e um fator de purificação de 5,86 foram atingidos para esta enzima com uma recuperação de 93,56 %.

Palavras-chaves: lipase alcalina; fracionamento com espuma; recuperação de proteínas

ABSTRACT

The application of foam fractionation for the recovery of extracellular alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* cultures

Foaming, an efficient method for the recovery of surface active solutes from diluted solutions, was successfully applied for the concentration of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* cultures. Experiments were carried out with non-ionic surfactant Triton X-114. Two parameters were studied, pH and nitrogen flow rate. The maximal recovery of this lipase was verified at pH 8.5 and 60 mL.min⁻¹ N₂ conditions. After optimization, an enrichment ratio of 8.77 and a purification factor of 5.86 were achieved for this enzyme along with 93.56 % recovery.

Keywords: alkaline lipase; foam fractionation; protein recovery

INTRODUCTION

Foam fractionation has been shown to be a feasible technique for the separation/concentration of a variety of proteins and enzymes (Crofcheck et al., 2003). In particular, foaming has potential utility, and is most efficient when diluted solutions are used, and can be applied to crude mixtures of compounds (Davis et al., 2001). Isolation and purification of a protein can require a number of sequential steps, often including multiple column chromatography operations. The direct scale-up of successful laboratory bench column chromatography methods to the industry scale, however, can be difficult and expensive (Lockwood et al., 1997). The advantages of foam separation include its mechanical and operational simplicity and, therefore, low capital and maintenance costs (Brown et al., 1998a).

The physical basis of separation using foaming is preferential adsorption at a gas-liquid interface (here the foam phase) of surface active components. Selective separation between different molecules is likely to be a result of differences in behavior at the gas-liquid interface, i.e., difference in surface activities. The ability of a protein to form a stable foam, depends on the protein's surface activity, which in turn depends its on primary structure, solvent enrichment, and physicochemical characteristics, as size, charge, hydrophobicity, and environmental conditions such as ionic strength, pH, and the presence of detergents, salts, sugars, and other additives (Brown et al., 1998a; 1998b).

Foam fractionation has been successfully applied for the concentration of surface-active compounds such as proteins (Lockwood et al., 1997; Noble et al., 1998) and enzymes (Crofcheck et al., 2003; Lambert et al., 2003; Gerken et al., 2006; Linke et al., 2005); surfactants (Davis et al., 2001); and starch (Fu et al., 2005). However, there are relatively few studies which have considered foaming for recovery of fermentation products directly from culture broths (Davis et al., 2001).

A number of lipases have been produced commercially, with the majority of them originating from fungi and bacteria. The steadily growing interest in microbial lipases is reflected because of their wide biotechnological and industry applications as

additives in foods (flavour modification), fine chemicals (synthesis of esters), detergents (hydrolysis of fats), waste water treatment (decomposition and removal of oil substances), cosmetics (removal of lipids), pharmaceuticals (digestion of oil and fats in foods), leather (removal of lipids from animal skins), medical (blood triglyceride assay), and biodiesel production (conversion of vegetable oil to alcohol ester) (Burkert et al., 2004; Jaeger and Eggert, 2002; Pandey et al., 1999).

Lipases are typically bipolar molecules distinguished by an interfacial mode of catalytic action, which made them suitable for isolation by foam fractionation (Linke et al., 2005). In this work, it was investigated the use of a recovery strategy where an active alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* was recovered in a foamate of a foam fractionation step. For optimization of foam fractionation, two different process parameters were studied: gas flow rate and pH.

MATERIAL AND METHODS

Strains

The microorganisms were isolated from fruits and soil from the Brazilian Northeast (Maceió, AL, and Aracaju, SE). The fungus *Fusarium oxysporum* LB152B was selected from Jenipapo fruit (Aracaju, SE). The cultures were maintained at 4°C on potato dextrose agar tubes.

Chemicals

All analytical chemicals and media components used the highest purity grade available commercially.

Lipase production

Fusarium oxysporum was cultivated for 96 h, at 30°C in a medium PDA (Potato Dextrose Agar). Precultures of *F. oxysporum* were prepared from a mycelial block (1cm²) as inoculum, which was excised from the agar plate and placed in a 300-mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of each culture medium, pH 6.0. After treatment with an UltraTurrax homogeneizer (Janke & Kunkel, Staufen, Germany), the fungal culture was incubated for 2 days at 160 rpm and 30°C. For the production of lipase, four different main culture media were prepared in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 250 mL of main medium: A (standard medium consisting of olive oil 1.0%; peptone 1.5%; yeast extract 0.5%; KH₂PO₄ 0.3%; MgSO₄.7H₂O 0.04% (w/v), at pH 6.0 (Lin et al. 1995, modified); B (standard medium containing 0.4% (v/v) Tween-80); C (standard medium without olive oil containing 0.4% (v/v) Tween-80); and D (medium SNL containing 0.4% (v/v) Tween-80, as described by Zorn et al. (2003)). Fermentation was carried out for 5 days at 30°C under 160 rpm shaking. The supernatant was separated from the mycelium by filtration. Media and equipment were autoclaved prior to use, and sterile techniques were applied throughout the procedures.

Protein Estimation

Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

Lipolytic assay

Lipase assay was determined by titrimetry using Tween 80 as substrate. The reaction mixture containing 2.16 g of Tween 80, 5 mL of 50 mM phosphate buffer, pH 8.0, and 200 µL of test enzyme solution was incubated at 40 °C for 30 min with orbital shaking at 160 rpm. The reaction was immediately stopped after incubation

by the addition of 5 mL ethanol 96%, and the liberated free fatty acids were titrated with 10 mM NaOH. Blanks were prepared with an inactivated enzyme solution. One unit (U) of lipase activity was defined as the amount which liberated 1 μmol of fatty acid per min under the specified conditions ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) (Linke et al., 2005).

Foam fractionation

To perform the foam fractionation, an equipment was made for as shown in the figure 1. This equipment consisted of a cylindrical glass chamber (18 cm length; 3 cm i.d.) with a porous frit (porosity 16-40 μm), a column (27 cm length; 3 cm i.d.), a glass bowl (500 mL), a horseshoe bend, and a receiving flask. The foam fractionation was carried out with 70 mL of enzyme solution. Nitrogen was passed through the frit, and rising foam collapsed in the receiver. Samples of the initial solution, of the foamate, as well as of retentate solution were taken to enzymatic activity and protein determination.

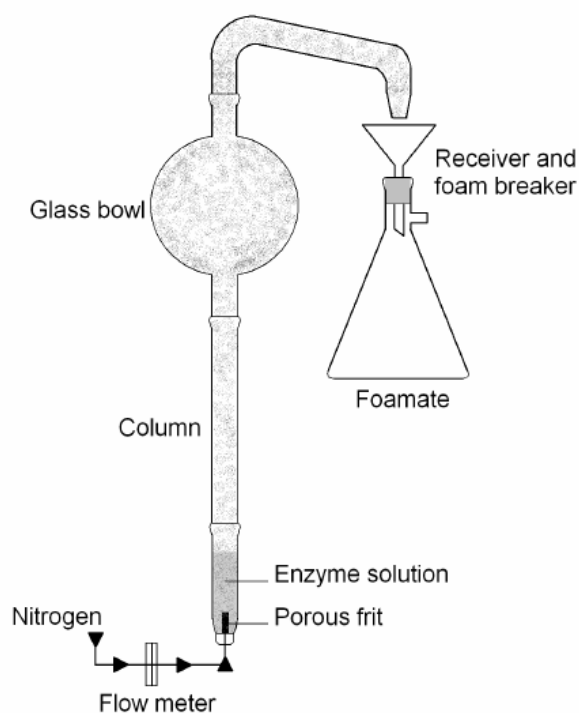


Figure 1: Scheme of the foam fractionation device (Linke et al., 2005).

Calculations

The performance of a foam fractionation system can be quantified using the enrichment and recovery of separation. The recovery (R in %), enrichment factor (E) and purification factor (P) were calculated by the following equations:

$$R = \frac{\text{activity (U)}_{\text{foamate}} \text{volume (mL)}_{\text{foamate}}}{\text{activity (U)}_{\text{initial}} \text{volume (mL)}_{\text{initial}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$E = \frac{\text{activity (U mL}^{-1}\text{)}_{\text{foamate}}}{\text{activity (U mL}^{-1}\text{)}_{\text{initial}}} \quad (2)$$

$$P = \frac{\text{specific activity (U mg}^{-1}\text{)}_{\text{foamate}}}{\text{specific activity (U mg}^{-1}\text{)}_{\text{initial}}} \quad (3)$$

All quantitative data represent average values of at least duplicate analyses.

RESULTS AND DISCUSSION

Alkaline lipase production under different medium composition

The activity of extracellular lipase of *Fusarium oxysporum* culture was evaluated after 5 days of incubation in four different media: A (standard medium); B (standard medium containing 0.4% (v/v) of Tween-80); C (standard medium without olive oil, containing 0.4% (v/v) of Tween-80); and D (medium SNL containing 0.4% (v/v) of Tween-80). Highest lipase specific activity of 32.2 U.mg⁻¹ was observed in medium D, an increase of 2.9 fold lipase production comparing to standard medium (Figure 2). The production of microbial lipases in generally is induced by fat-related carbon sources. Rapp (1995) observed the production of extracellular lipase activity in growing cultures of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* was further enhanced by addition of olive oil, trimyristin, Span 85 and oleic acid. On another hand, some works have showed that Tween 80 is a suitable carbon source for production of microbial lipases (Li et al., 2004; Linke et al., 2005). In this work, both carbon sources, olive oil and Tween 80 showed to be a potential inducer for lipase

production. However, the medium composition could be made higher influence in the lipase production, as it showed in medium D in a Figure 2.

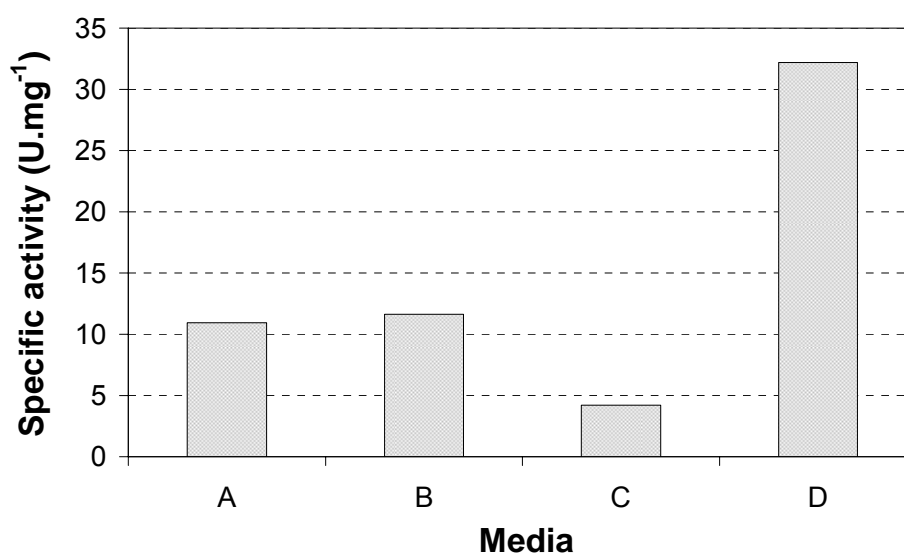


Figure 2: Effect of medium in extracellular alkaline lipase production. The lipase activity was determined as described in methods for each medium.

The lipase production was verified during 6 days (Figure 3), and the highest specific activity (35.0 U.mg⁻¹) was observed after 4 days in SNL medium using Tween 80 as inductor. This supernatant was used for foam fractionation perform.

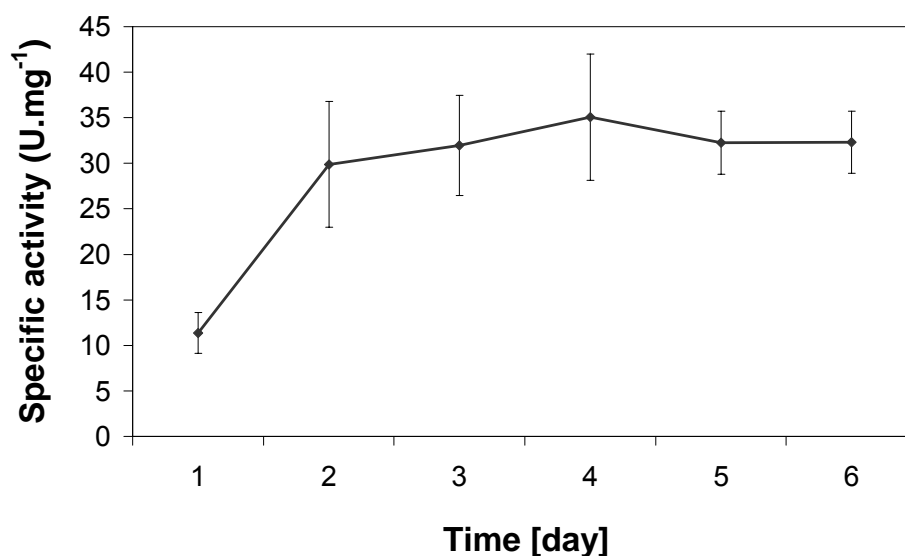


Figure 3: Extracellular alkaline lipase production under SNL medium, pH 6.0, 30°C condition, using Tween 80 as inductor. The lipase activity was determined as described in methods. The experiment was performed in triplicate and bars represent the standard derivation.

Foam fractionation for alkaline lipase recovery from the culture supernatant

First of all, the influence of pH in the recovery of lipase from culture supernatant was studied varying pH values of the enzyme-containing solutions. All other parameters were kept constant: flow rate (60 mL.min⁻¹ N₂), period of fractionation perform (45 min), temperature (18 ± 2°C), on a 70 mL scale. The foam fractionations were performed at pH from 6.0 to 8.5. The maximal and minimal recoveries of lipase were observed to pH 8.5 and 6.0, respectively. The maximum loss of activity during the fractionation process was around 5%, probably because the enzyme damage in foaming was reduced at this pH condition.

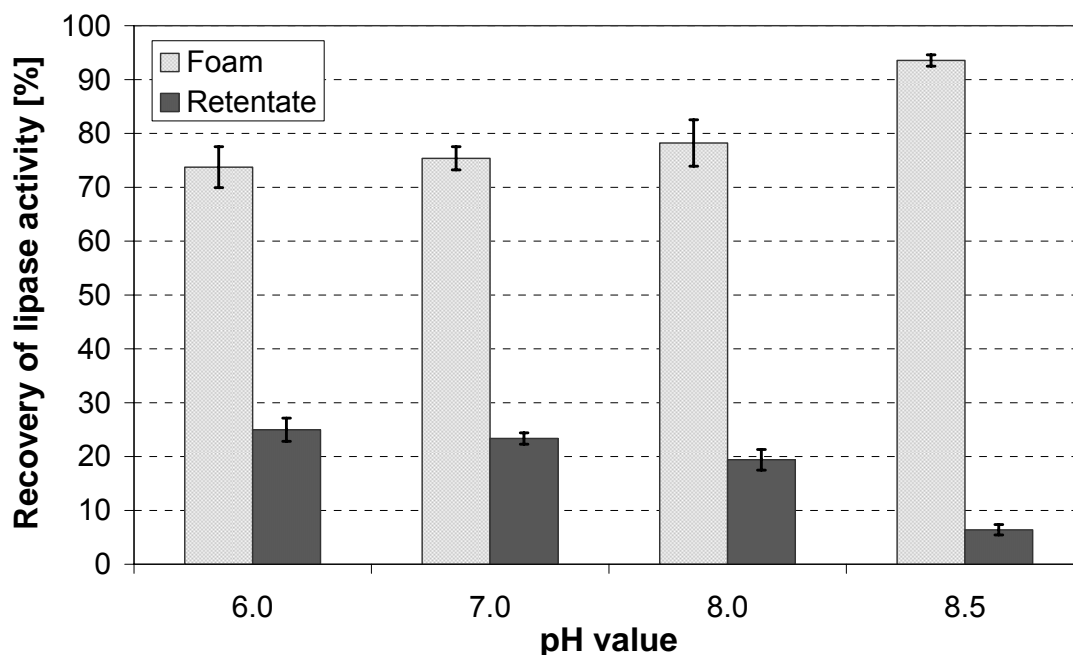


Figure 4: Effect of pH on foam fractionation performance. Recovery of lipase activity was calculated for foamate and retentate in each experiment. The experiments conditions were 60 mL.min⁻¹ N₂, 18 ± 2°C and 45 min. The experiments were performed in duplicate and bars represent the standard derivation.

Although, several studies have showed that the target protein can be transported more efficient into the foamate at its pI (Clarkson et al., 2000; Liu et al., 1998; Lockwood et al., 1997), the lipase from *Fusarium oxysporum* has the maximal transport into the foamate at pH 8.5, far from the pI observed for native isoenzymes from this microorganism (4.6 to 7.15). Similar behavior was observed for lipase from *Pleurotus sapidus* (Linke et al., 2005).

Loha (1999) found that the effectiveness of the batch foam fractionation of cellulases was strongly dependent on the pH of the initial solution. With an increase in pH from 2 to 7, the separation ratio (defined as the ratio of the foamate and residue concentrations) decreased to a minimum. That ratio increased from pH 7 to 11.

Brown et al. (1998b) observed that the enrichment ratios for β -casein are high with enrichments decreasing with increasing protein concentration. Another contributory factor could have been the pH used. It should be noted that to ensure that proteins were completely solubilized, the pH was 6.25 for experiments with a lysozyme concentration of 0.5 mg/mL, but pH was 9.0 for experiments with a lysozyme concentration of 2.0 mg/mL. The pI of β -casein is 5.3 and therefore, higher enrichments would be expected at pH 6.25 than at pH 9.0, because enrichment is generally greater at the isoelectric point.

The second parameter studied was the influence of flow rate in recovery of lipase from *F. oxysporum*. As it showed in a figure 5, more than 90% of recovery was obtained using 60 mL.min⁻¹ N₂ of flow rate.

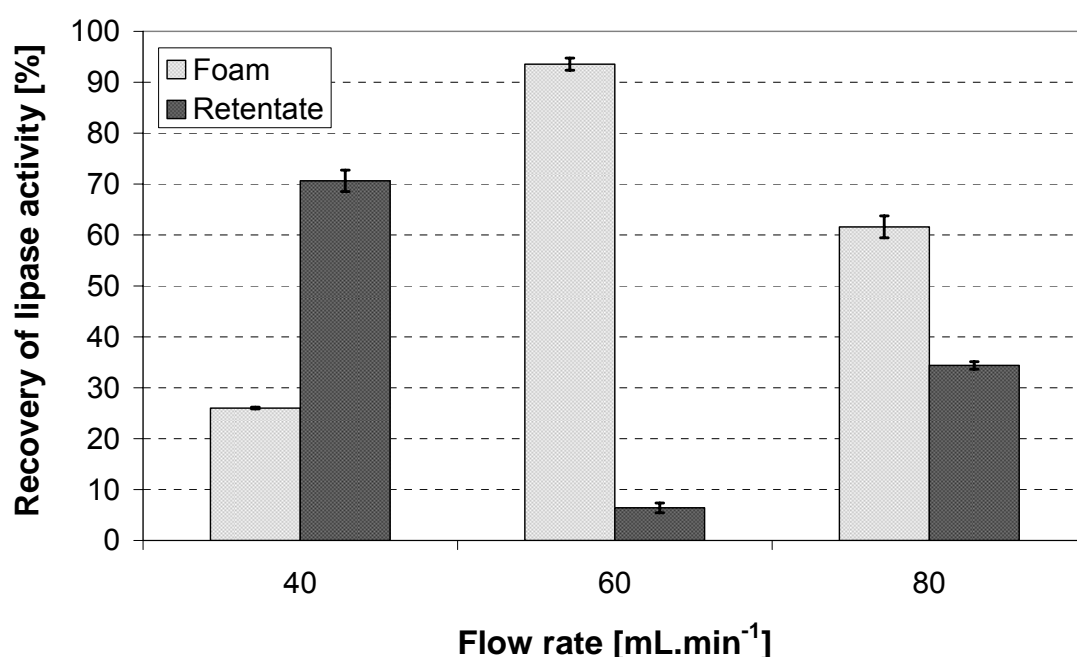


Figure 5: Effect of flow rate on foam fractionation performance. Recovery of activity was calculated for foam and retentate in each experiment. The experiments conditions were pH 8.5, 18 ± 2°C and 45 min. The experiments were performed in duplicate and bars represent the standard derivation.

Enrichment ratio decreases as gas-flow rate is increased. High levels of gas-flow rate cause (1) greater amounts of liquid to be taken into the foam, and (2) the residence time of foam in the column to be reduced (limiting liquid drainage and internal reflux). Both these factors results in an increase in foam-flow rates, which leads to a reduction in protein concentration in the foam, and hence, to lower enrichment ratios. As shown by Brown et al. (1998a), gas-flow rate was statistically significant upon separation ratio, low gas-flow rates promoted higher protein concentrations in the foam phase. Higher gas flow rates increase the rate of protein removal from the pool, however, due to greater liquid hold-up in the foam, the protein concentration in the foam is limited, resulting in lower separation ratios.

After optimization of pH and flow rate parameter, the condition of foam fractionation was determined at pH 8.5 and 60 mL.min⁻¹ N₂. This experiment yielded an enrichment ratio of 8.77 was achieved for alkaline lipase along with 93.5 %, and a purification factor of 5.86 (Table 1).

Table 1: Summary of results after foam fractionation from culture supernatant under pH 8.5, 60 mL.min⁻¹ N₂, 18 ± 2°C and 45 min conditions.

	Total volume (mL)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Recovery of activity (%)	Recovery of protein (%)	Purification factor (fold)	Enrichment factor (fold)
Supernatant	70.0	615.42	26.39				
Foam	7.5	576.25	4.21	93.56	16.05	5.86	8.77
Retentate	56.0	39.79	20.21				

CONCLUSION

In this study, it was demonstrated that the foam recovery is an efficient method for the recovery of lipase. Flow rate and pH value have an important effect on lipase recovery using foam fractionation method. The maximal recovery was obtained at pH 8.5 and 60 mL.min⁻¹ N₂ of flow rate. This method is simple and has the added benefit of being low in operational and capital costs. It is useful in suggesting ways to apply this methodology to a variety of industry application.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Prof. Dr. Ralf Berger, Dr. Holger Zorn and Dr. Diana Linke, from Hanover University, Germany, for supplying the foam equipments and technical assistance in this work. The financial assistance provided by CNPq and Recope/Finep.

REFERENCES

- Brown, A.K.; Kaul, A.; Varley, J. Continuous foaming for protein recovery: Part I. Recovery of β -casein. **Biotechnology and Bioengineering**, 62(3): 280-290, 1998a.
- Brown, A.K.; Kaul, A.; Varley, J. Continuous foaming for protein recovery: Part II. Selective recovery of protein from binary mixtures. **Biotechnology and Bioengineering**, 62(3): 291-300, 1998b.
- Burkert, J.F.M.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, 91:77-84, 2004.
- Clarkson, J.R. ; Cui, Z.F. ; Darton, R.C. Effect of solution conditions on protein damage in foam. **Biochemical Engineering Journal**, 4:107-114, 2000.

- Crofcheck, C.; Loisel, M.; Weekley, J.; Maiti, I.; Pattanaik, S.; Bummer, P.M.; Jay, M. Histidine tagged protein from Tobacco extract by foam fractionation. **Biotechnology Progress**, 19: 680-682, 2003.
- Davis, D.A.; Lynch, H.C.; Varley, J. The application of foaming for recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, 28: 346-354, 2001.
- Fu, Y.-C.; Huang, P.-Y.; Chu, C.-J. Use of continuous bubble separation process for separating and recovering starch and mucilage from yam (*Dioscorea pseudojaponica* yamamoto). **LWT**, 38:735-744, 2005.
- Gerken, B.M.; Nicolai, A.; Linke, D.; Zorn, H.; Berger, R.G.; Parlar, H. Effective enrichment and recovery of laccase C using continuous foam fractionation. **Separation and Purification Technology**, 49 (3): 291-294, 2006.
- Jaeger, K.-E. and Eggert, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, 13:390-397, 2002.
- Lambert W.D.; Du, L. ; Ma, Y. ; Loha, V. ; Burapatana, V.; Prokop, A.; Tanner, R.D.; Pamment, N.B. The effect of pH on the foam fractionation of β -glucosidase and cellulase. **Bioresource Technology**, 87:247-253, 2003.
- Li, C.-Y.; Cheng, C.-Y.; Chen, T.-L. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, 19:25-31, 2004.
- Lin, S.-F., Chiou, C.-M., Tsai, Y.-C. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Biotechnology Letters** 17: 956-962, 1995.
- Linke, D.; Zorn, H.; Gerken, B.; Parlar, H.; Berger, R.G. Foam fractionation of exo-lipases from a growing fungus (*Pleurotus sapidus*). **Lipids**, 40(3): 323-327, 2005.

- Liu, Z.; Liu, Z.; Wang, D.; Ding, F.; Yuan, N. On the denaturation of enzymes in the process of foam fractionation. **Bioseparation**, 7: 167-174, 1998.
- Lockwood, C.E.; Bummer, P.M.; Jay, M. Purification of proteins using foam fractionation. **Pharmaceutical Research**, 14 (11):1511-1515, 1997.
- Loha, V. Preserving the activity of cellulase in a batch foam fractionation process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 77: 701-712, 1999.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Lewis Farr, A.; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. The **Journal of Biological Chemistry**, 193: 265-275, 1951.
- Noble, M. ; Brown, A. Jauregi, P.; Kaul, A.; Varley, J. Protein recovery using gas-liquid dispersions. **Journal of Chromatography B**, 711: 31-43, 1998.
- Pandey, A.; Benjamin, S.; Soccol, C.R.; Nigam, P.; Krieger, N.; Soccol, V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 29: 119-131, 1999.
- Zorn, H.; Breithaupt, D.E.; Takenberg, M.; Schwack, W.; Berger, R.G. Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of arigold Flowers (*Tagetes erecta* L.) and Red Paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. **Enzyme Microbiology Technology**, 32: 623-628, 2003.

CONCLUSÕES GERAIS

De um total de 216 microrganismos isolados de frutas e solo do nordeste brasileiro, apenas um microrganismo foi selecionado por produzir maior atividade lipolítica em meio líquido. A cepa de número 152 B foi identificada como *Fusarium oxysporum* através de análise morfológica e crescimento em meios padrões, e por biologia molecular. Este trabalho mostrou que estas duas ferramentas devem ser complementares uma a outra numa identificação, e que a biologia molecular, apesar de sua alta sensibilidade e qualidade, não exclui a avaliação morfológica de um microrganismo.

A produção de lipase depende da composição do meio de cultura e das condições da fermentação. A maior produção de lipase alcalina extracelular por *Fusarium oxysporum* foi verificada com meio de cultura contendo 2% de óleo de oliva (m/v) como fonte de carbono, 0,3% de peptona (m/v) e 0,2% de extrato de levedura (m/v) como fontes de nitrogênio. Também foi verificado que a máxima quantidade de atividade lipolítica produzida foi em pH 6,0 e a 30 °C.

A lipase alcalina de *F. oxysporum* mostrou possuir algumas propriedades de importância significativa para a indústria, em particular a sua estabilidade a pH alcalino e altas temperaturas, e ampla especificidade frente a substratos, sendo capaz de clivar ligações ésteres de ácidos graxos de cadeia média e longa, e estabilidade a vários surfactantes e detergentes comerciais.

A lipase de *Fusarium oxysporum* foi purificada 20 vezes com rendimento de 1,32 % após precipitação com sulfato de amônio, cromatografia em colunas de DEAE-Sephacryl-200. A lipase purificada apresentou uma única banda em gel SDS-PAGE, mas no gel IEF-PAGE foram detectadas três isoformas, *Lip 1*, *Lip 2* e *Lip 3*. O seqüenciamento de aminoácidos da *Lip 1* mostrou que esta enzima tem alta similaridade com a lipase de *F. heterosporum*.

Após purificação, a lipase de *F. oxysporum* apresentou a maior atividade lipolítica a 40°C, temperatura esta inferior à maior atividade lipolítica encontrada para a lipase

bruta. Também ocorreu uma diminuição da estabilidade da enzima purificada comparada à enzima bruta. Quanto ao pH, a lipase purificada apresentou o mesmo pH ótimo de reação que a enzima bruta, porém a enzima purificada apresentou ser mais estável a pHs alcalinos, mantendo sua potencialidade para aplicação em detergentes.

Neste estudo também foi demonstrado que o fracionamento com espuma é um método eficiente para a recuperação de lipase. Após otimização desenvolvendo o fracionamento em pH 8,5 e 60 mL.min⁻¹ de nitrogênio, foi atingida uma recuperação de cerca de 93%, com um fator de purificação de 5,8 vezes. Este método é simples e com baixos custos, podendo ser implementado facilmente na indústria.